

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE SPECTROSCOPIQUE DE L'INTERACTION DU FULLERÉNOL AVEC DES
MEMBRANES CELLULAIRES MODÈLES ET
SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES À BASE DE FULLERÈNE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
PATRICK BRISEBOIS

SEPTEMBRE 2012

SEPTEMBRE 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SERVICE DES BIBLIOTHÈQUES

AVERTISSEMENT

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 - Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement n^o8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*«Every morning, when I open my eyes
I feel gravity, keeping me grounded on this planet,
And emotional flow, traveling my material body*

A sound wave, an electrical discharge, a vibration in my head

I hear my thoughts, wondering:

Where are you Mom?

Crying and smiling like a child

Seeking deeply for an answer

My heart tumbles and faints

Sensing love from up above:

In heaven. Not alone...!

I breathe, feeling the pain of oxygen burning my soul

Shouting with all my strength:

Wait for me Mother, I am coming next. Today»

-Patrick P. Brisebois

Je dédie ce mémoire à ma mère,

Gisèle Grandmont,

Décédée en août 2010

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier principalement mes co-directeurs de recherche Isabelle Marcotte et René Roy pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et pour m'avoir donné une chance unique de participer à un projet de recherche autant multidisciplinaire que captivant. Aussi je tiens à souligner leur soutien inconditionnel et leur apport scientifique qui ont contribué à la réalisation de mes travaux de recherche et de ce mémoire. J'aimerais également souligner la participation incroyable de Yoann M. Chabre (spécialiste en chimie de synthèse organique) et d'Alexandre A. Arnold (spécialiste en RMN de l'état solide) pour leur assistance dans un contexte de recherche multidisciplinaire et pour leur implication soutenue au niveau de l'investigation scientifique. Je me dois de remercier mes collègues de laboratoire Germain Larocque, Étienne Chartrand, Andrée Gravel, Maïwenn Beaugrand, Frédéric Byette, Marc-Olivier Séguin-Heine, Catherine Tardy-Laporte, les stagiaires de recherche Caroline Bourgeois et Pierre Bazire pour leur soutien et leur assistance technique, ainsi que tout le service Pharmaqam/NanoQAM, tout spécialement Tze Chieh Shiao et Gwenaël Chamoulaud.

Finalement, ce projet a été réalisé avec le soutien du Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT), du Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF) et de la Fondation Canadienne pour l'Innovation (FCI). Je dois remercier aussi le programme de formation en biologie chimique (Institut de Recherche en Santé du Canada) pour une bourse d'étude reçue personnellement dans le cadre d'un programme de maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES.....	xiv
LISTE DES UNITÉS.....	xxi
RÉSUMÉ.....	xxiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Fullerène-Découverte-Structure-Applications.....	1
1.2 L'utilisation des fullerènes en nanomédecine	3
1.3 Problématique de la résistance des bactéries aux médicaments.....	6
1.4 Buts de la recherche.....	8
1.4.1 Études spectroscopiques des interactions avec les membranes cellulaires modèles.....	9
1.4.2 Les membranes modèles: Bactéries/Eucaryotes.....	11
1.4.3 Synthèse d'agents antimicrobiens bioactifs à base de fullerène.....	14
CHAPITRE II	
ASPECTS THÉORIQUES.....	16
2.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	16
2.1.1 Élongations principales (étude de phospholipides).....	17
2.1.2 Transition de phase gel-fluide.....	18
2.1.3 Phénomène de thermotropisme.....	19
2.2 Les interactions dominantes en RMN de l'état solide (RMN-ÉS).....	20
2.2.1 Effet Zeeman.....	20
2.2.2 Anisotropie de déplacement chimique.....	22
2.2.3 Couplage dipolaire.....	23
2.2.4 Couplage quadripolaire.....	24

2.3	RMN et étude des systèmes phospholipides/membranes.....	26
2.3.1	RMN du ^{31}P statique/MAS.....	26
2.3.2	RMN du ^2H (deutérium).....	32
CHAPITRE III		
COMPARATIVE STUDY OF THE INTERACTION OF FULLERENOL NANOPARTICLES WITH EUKARYOTIC AND BACTERIAL MODEL MEMBRANES USING SOLID-STATE NMR AND FTIR SPECTROSCOPY.....		34
3.1	Abstract.....	36
3.2	Introduction.....	37
3.3	Materials and methods.....	39
3.3.1	Materials.....	39
3.3.2	Sample preparation.....	40
3.3.3	Solid-state NMR experiments.....	40
3.3.4	FTIR experiments.....	41
3.4	Results.....	42
3.4.1	Interaction of fulleranol with model eukaryote membranes.....	42
3.4.2	Interaction of fulleranol with model bacterial membranes.....	47
3.5	Discussion.....	51
3.6	Conclusion.....	53
3.7	Acknowledgments.....	54
CHAPITRE IV		
SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES.....		55
4.1	Introduction.....	55
4.1.1	La synthèse du C_{60}	55
4.1.2	La réactivité du C_{60}	57
4.1.3	Les réactions d'addition.....	58
4.1.4	La bromination du C_{60}	59
4.1.5	L'hydroxylation du C_{60}	60
4.1.6	Les réactions de cycloaddition.....	61
4.1.7	La cycloaddition 1,3-dipolaire.....	61
4.1.8	Les réactions de cyclopropanation.....	63
4.1.9	Les fulléroglyco "clusters".....	65

4.2	Stratégie: Plan de synthèse.....	71
4.2.1	La réaction de Williamson.....	71
4.2.2	La réduction de Staudinger.....	73
4.2.3	La "Click chemistry".....	74
4.2.4	Calcul des ratios sécuritaires carbone/azote.....	75
4.2.5	Évaluation du nombre de substituants en périphérie du fullerène.....	76
4.3	Résultats/Discussion.....	77
4.3.1	Synthèse du précurseur $C_{60}(OH)_n(OCH_2CH_2N_3)_{10}$	77
4.3.2	Synthèse du dérivé cationique $C_{60}(OH)_n(OCH_2CH_2NH_3^+Cl^-)_{10}$	88
4.3.3	Synthèse du fullerène polymannosylé ("sugar ball").....	91
4.3.4	Essais de la réaction de Williamson sur le fullerénol.....	95
4.3.5	Solubilité des nanoparticules.....	100
4.4	Conclusion.....	101
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	102
	PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	104
	Exp.1 Généralités.....	104
	Exp.2 Protocoles généraux.....	105
	Exp.3 Caractérisation des composés.....	108
	BIBLIOGRAPHIE.....	112

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure du fullerène (C_{60}).....	1
1.2 Structure du nano- C_{60}	3
1.3 (A) Formule générale des hydroxyfullerènes et (B) structure du tris-carboxy- C_{60} (C_3).....	5
1.4 Structure simplifiée du fullerénol ($C_{60}(OH)_{24}$).....	10
1.5 Représentation schématique d'une membrane biologique.....	11
1.6 Structure (A) du cholestérol et (B) de la dipalmitoylphosphatidyl - choline (DPPC) et de la dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG).....	13
1.7 Schéma (A) d'une vésicule multilamellaire (MLV) et (B) d'une bicouche fluide de phospholipides.....	13
1.8 Approche synthétique pour le nouveau design de molécules dérivées de la famille des fullerénols bioactives.....	15
2.1 Transition de phase gel-fluide des phospholipides.....	18
2.2 Thermotropisme des bandes d'élongation CH_2 asymétrique et symétrique d'un phospholipide.....	19
2.3 Diagramme des niveaux d'énergie d'un noyau de spin 1/2 sous l'influence de l'effet Zeeman.....	21
2.4 Anisotropie de déplacement chimique.....	22
2.5 Couplage dipolaire entre 2 noyaux.....	23
2.6 Diagramme des niveaux d'énergie (figure du haut) et spectres théoriques (figure du bas) d'un noyau de spin 1 sous l'influence de l'effet Zeeman et de l'effet quadripolaire.....	25
2.7 (A) Distribution de spins 1/2 non orientés et (B) spectre de poudre.....	27

2.8	Distribution de spins 1/2 sur une sphère.....	28
2.9	Distribution de symétrie cylindrique.....	29
2.10	Spectre de RMN ^{31}P statique de phospholipides dans une vésicule multilamellaire (MLV).....	30
2.11	Spectre de RMN ^{31}P d'un phospholipide avec la technique de la rotation à l'angle magique.....	31
2.12	Représentation des liens C-D d'un phospholipide deutéré orienté dans le B_0	33
2.13	Structure et spectres de RMN ^2H de phospholipides deutérés dans une vésicule multilamellaire.....	33
3.1	Temperature dependence of the static ^{31}P NMR spectra of DPPC/Chol (left column) and DPPC/DPPG membranes (right column) at a molar ratio of 4:1, without and with 5 mol% FulOH.....	44
3.2	Temperature dependence of the ^{31}P MAS NMR spectra of DPPC/Chol (left column) and DPPC/DPPG membranes (right column) at a molar ratio 4:1, without and with 5 mol% FulOH obtained at an MAS frequency of 5 kHz.....	45
3.3	Temperature dependence of the ^2H NMR spectra of DPPC- d_{62} /Chol (left column) and DPPC- d_{62} /DPPG membranes (right column) at a molar ratio of 4:1, without and with 5 mol% FulOH.....	46
3.4	Temperature dependence of the frequency of the CH_2 asymmetric stretching vibration of (A) DPPC in DPPC/Chol; (B) DPPG in DPPC/DPPG and (C) the CD_2 asymmetric stretching vibration of DPPC- d_{62} in DPPC- d_{62} /DPPG membranes at a molar ratio of 4:1, without and with 5 mol% FulOH.....	48
4.1	Approche synthétique pour la première synthèse du fullerène.....	55
4.2	Approche synthétique pour la première synthèse multi-étapes du fullerène.....	56
4.3	Représentation d'une jonction de cycle (A) 6,6 et (B) 6,5 du fullerène..	57
4.4	Structure simplifiée du bromofullerène $\text{C}_{60}\text{Br}_{24}$	59

4.5	Structure simplifiée du $C_{60}(OH)_{24}$	60
4.6	Schéma réactionnel de la réaction de Prato.....	62
4.7	Schéma réactionnel de la synthèse d'un azafullerène.....	62
4.8	Schéma réactionnel de la réaction de cyclopropanation Bingel-Hirsch et structure d'un fullerène hexavalent.....	64
4.9	Structures (A) d'un trisaccharide; (B) d'un disaccharide et (C) d'un monosaccharide.....	65
4.10	Structures d'un fullerène amphiphile bis-mannosylé préparé par la méthode de Bingel-Hirsch (figure du haut) et d'un fulléroglycodendri-mère amphiphile (figure du bas).....	68
4.11	Structure d'un fullerène hexavalent du type "sugar ball".....	69
4.12	Structure d'un fullerène pentavalent de la catégorie des "sugar balls" préparé via l'addition multiple d'organocupriens.....	71
4.13	Mécanismes de la réaction d'éthérification de Williamson pour les dérivés du C_{60}	72
4.14	Mécanisme de la réduction de Staudinger.....	73
4.15	Approche synthétique pour la synthèse d'un fullerène polycationique préparé avec la méthode de réduction de Staudinger.....	74
4.16	Approche synthétique pour la synthèse d'un fullerène polymannosylé ("sugar ball") préparé à l'aide de la "Click chemistry".....	75
4.17	Approche synthétique pour la synthèse d'un fullerène polysubstitué préparé à l'aide de la réaction de Williamson sur le bromofullerène.....	77
4.18	Synthèse de 1 à partir du bromofullerène et du 2-azidoéthanolate de lithium.....	79
4.19	Cinétique de la synthèse de 1 suivie par analyse thermogravimétrique.....	81
4.20	Structure proposée de 1 et attribution des déplacements chimiques de RMN.....	82

4.21	Spectres de RMN ^1H et ^{13}C de 1 (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C ; CDCl_3 , δ , ppm).....	83
4.22	Spectre d'ATR de 1	83
4.23	Thermogrammes du C_{60} , du $\text{C}_{60}\text{Br}_{24}$ et de 1	87
4.24	Synthèse de 2 à partir de 1 dans les conditions de Staudinger.....	88
4.25	Conversion de l'élongation N_3 (2086 cm^{-1}) de 1 dans les conditions de Staudinger.....	89
4.26	Spectre d'ATR de 2	90
4.27	Image de spectroscopie SEM de 2 sur plaquette de silice.....	91
4.28	Synthèse de 3 à partir de 1 et 4 à l'aide la "Click chemistry".....	92
4.29	Spectres de RMN ^1H et ^{13}C de 3 (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C ; CDCl_3 , δ , ppm).....	94
4.30	Schéma réactionnel de l'éthérification de Williamson.....	95
4.31	Conditions optimisées pour la synthèse de 5	97
4.32	Cinétique de la synthèse de 5 suivie par analyse thermogravimétrique.....	98
4.33	Images des composés en solution et sous la forme solide.....	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Exemples d'applications des fullerènes dans l'industrie des nanotechnologies.....	2
2.1 Élongations principales des phospholipides en IRTF.....	17
3.1 ^{31}P chemical shift anisotropy ($\Delta\sigma \pm 0.2$ ppm) of DPPC in DPPC/Chol membranes calculated from static and MAS spectra.....	43
3.2 ^{31}P chemical shift anisotropy ($\Delta\sigma \pm 0.2$ ppm) of DPPC and DPPG in DPPC/DPPG membranes calculated from static and MAS spectra.....	49
4.1 Conditions réactionnelles pour la synthèse d'un fullerène poly-substitué préparé à l'aide de la réaction de Williamson sur le bromofullerène.....	78
4.2 Rendements cumulatifs de la synthèse de 1	82
4.3 Élongations principales de 1 en ATR.....	85
4.4 Différentes conditions réactionnelles étudiées pour la synthèse de 5 dans les conditions de Williamson.....	96
4.5 Rendement cumulatifs de la synthèse de 5	97

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES

asy	Asymétrique
Ac	Acétyle
ADC	Anisotropie de déplacement chimique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AT	Temps d'acquisition (<i>acquisition time</i> en seconde)
ATR	Méthode de spectroscopie infrarouge à réflectance totale atténuée (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
B:	Base
B _{eff}	Champ magnétique effectif
B _i	Champ magnétique induit
B ₀	Champ magnétique externe
cos	Cosinus
¹³ C	Isotope 13 du carbone
C ₆₀	Fullerène
C ₆₀ Br ₂₄	Tétracosabromofullerène
C ₆₀ (OH) ₂₄	Tétracosahydroxyfullerène (fullerénol)
CaF ₂	Fluorure de calcium
CBr ₄	Tétrabromométhane
CD ₂	Méthylène deutéré
CD ₃	Méthyle deutéré
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CH ₂	Méthylène

CH ₃	Méthyle
Chol	Cholestérol
CO	Monoxyde de carbone
CO ₂	Dioxyde de carbone
CuSO ₄	Sulfate de cuivre
CYCLOPS	<i>Cyclically Ordered Phase Sequence</i>
d ₁	Délai de recyclage (en seconde)
d ₆₂	Nombre de deutérium sur les chaînes acyle
décomp.	Décomposition
D	Constante Brownienne de diffusion (m ² /s)
D ₂ O	Oxyde de deutérium
DBU	1,8-Diazabiscycloundéc-7-ène
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPC-d ₆₂	Dipalmitoylphosphatidylcholine perdeutérée
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycérol (sel de sodium)
éq.	Équivalent
ΔE	Différence d'énergie entre deux transitions
E _d	Énergie de couplage dipolaire
Fe	Fer
FID	Signal de précession libre (<i>free induction decay</i>)
FulOH	Fullerénol

h	Constante de Planck ($6,62606957 \times 10^{-34}$ J s)
H (^1H)	Proton
^2H	Deutérium
H_2	Hydrogène
H_2O	Eau
H_3PO_4	Acide phosphorique
HCl	Acide chlorhydrique ou chlorure d'hydrogène
HCN	Acide cyanurique
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (<i>high performance liquid chromatography</i>)
Hres	Heures
\vec{I}	Moment magnétique de spin
I_2	Iode
IRM	Imagerie de résonance médicale
IRTF	Infrarouge à transformée de Fourier
Jrs	Jours
k	Kilo
KBr	Bromure de potassium
KCl	Chlorure de potassium
LB	Facteur d'élargissement de bande (<i>Line broadening</i> en Hz)
Li	Lithium
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
M_m	Masse molaire

MAS	Rotation à l'angle magique (<i>magic angle spinning</i>)
MCT	Mercure-cadmium-tellure
Min	Minute
MLV	Vésicule multilamellaire (<i>multilamellar vesicle</i>)
<i>n</i> -BuLi	Butyllithium
n.d.	non disponible
N	Nombre de points
N ₂	Azote gazeux
N ₃	Azoture
Na	Sodium
NaAsc	Ascorbate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaH	Hydruure de sodium
NH ₃	Ammoniac
NH ₃ ⁺	Ion ammonium
NPs	Nanoparticules
pK _a	Constante de dissociation acide
³¹ P	Phosphore-31
PC	Phosphatidylcholine
PEG	Polyéthylène glycol
PG	Phosphatidylglycérol
PPh ₃	Triphénylphosphine
r ₁₂	Distance entre les noyaux 1 et 2

R	Substituant variable
RF	Radio-fréquence
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN-ÉS	Résonance magnétique nucléaire de l'état solide
RPE	Résonance paraélectronique
s	Seconde
sin	Sinus
sp ²	Hybridation trigonale
sp ³	Hybridation tétradrique
sym	Symétrique
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
S _N 2	Substitution nucléophile de type 2
S _N 2'	Substitution nucléophile de type 2 prime
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SS-NMR	<i>Solid-state nuclear magnetic resonance</i>
T	Tesla (unité de mesure du champ magnétique)
T ₂	Temps de relaxation spin-spin (ms)
T _m	Température de transition de phase (melting temperature)
TBABr	Bromure de tétrabutylammonium
TBACl	Chlorure de tétrabutylammonium
TBAI	Iodure de tétrabutylammonium
TBAOH	Hydroxyde de tétrabutylammonium

TGA	Analyse thermogravimétrique (<i>thermogravimetric analysis</i>)
THF	Tétrahydrofurane
T.P.	Température pièce
Ts	Tosylate
α	Angle longitudinal du tenseur d'ADC dans le B_0 (degré)
β	Angle latitudinal du tenseur d'ADC dans le B_0 (degré)
δ	Déplacement chimique anisotrope (Hz, rad, ppm)
$\delta_{ }$	Déplacement chimique parallèle au champ magnétique
δ_{\perp}	Déplacement chimique perpendiculaire au champ magnétique
δ_{iso}	Déplacement chimique isotrope (Hz, rad, ppm)
γ	Rapport gyromagnétique ($\text{rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
η	Paramètre d'asymétrie ($0 < \eta < 1$)
π	Nombre <i>pi</i> (3,14159265)
σ	Paramètre d'écran chimique (constante de blindage)
$\Delta\sigma$	Anisotropie moyennée ($\sigma_{ } - \sigma_{\perp}$)
$\sigma_{ }$	Composante de l'anisotropie parallèle au champ magnétique
σ_{\perp}	Composante de l'anisotropie perpendiculaire au champ magnétique
θ	Angle θ de la magnétisation (degré)
$\vec{\mu}$	Moment magnétique de spin
$\vec{\mu}_1$	Moment magnétique du noyau 1
$\vec{\mu}_2$	Moment magnétique du noyau 2
ν_{asy}	Étirement asymétrique

ν_{sym}	Étirement symétrique
ν_0	Fréquence de Larmor (en Hz, ppm)
$\Delta\nu_Q$	Écart quadripolaire (en Hz)
ω	Fréquence de résonance entre deux transitions (Hz, rad, ppm)
\sim	Même ordre de grandeur
\approx	Environ égal à

LISTE DES UNITÉS

°	Unité de mesure d'angle (degré)
%	Pourcentage
°C	Unité de mesure de la température (degré Celcius)
cm ⁻¹	Unité de fréquence (1/centimètre)
g/mol	Masse molaire (gramme par mole)
Hz	Unité de mesure de fréquence (hertz)
kg	Unité de mesure de masse (kilogramme) (1×10^3 g)
kHz	Unité de mesure de fréquence (kilohertz) (1×10^3 Hz)
kJ	Unité de mesure d'énergie (kilojoule) (1×10^3 J)
mg	Unité de mesure de masse (milligramme) (1×10^{-3} g)
mL	Unité de mesure de volume (millilitre) (1×10^{-3} L)
mm	Unité de mesure de distance (millimètre) (1×10^{-3} m)
mM	Unité de mesure de concentration (millimolaire) (1×10^{-3} M)
mol%	Ratio molaire (pourcentage)
ms	Unité de mesure du temps (milliseconde) (1×10^{-3} s)
MHz	Unité de mesure de fréquence (méga hertz) (1×10^6 Hz)
nm	Unité de mesure de distance (nanomètre) (1×10^{-9} m)
ppm	Partie par million (1×10^{-6}).
p/v	Rapport poids/volume (%)
rad	Unité de mesure d'angle (radian)
μL	Unité de mesure de volume (microlitre) (1×10^{-6} L)

μm	Unité de mesure de distance (micromètre) $1 \times 10^{-6} \text{ m}$
μmole	Unité de mesure de concentration (micromole) ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$)
μs	Unité de mesure du temps (microseconde) ($1 \times 10^{-6} \text{ s}$)

RÉSUMÉ

Les fullerènes natifs sont reconnus pour leur faible solubilité dans l'eau et par conséquent pour former des agrégats insolubles (nano- C_{60}) dans les fluides biologiques. Au contraire, les hydroxyfullerènes ($C_{60}(OH)_n$) sont très solubles dans les milieux aqueux. Ils sont biocompatibles et démontrent une toxicité *in vivo* très faible sur les lignées cellulaires humaines. Les mécanismes d'interaction entre ces nanoparticules solubles dans l'eau et les membranes biologiques ne sont pas très connus et pourraient constituer un nouveau mode d'action pour lutter contre les bactéries résistantes aux médicaments et permettre le développement de nouveaux agents antibiotiques plus efficaces.

Les buts principaux de cette recherche sont de vérifier l'effet des fullerénols, $C_{60}(OH)_{24}$, sur les membranes cellulaires modèles à l'aide de la spectroscopie de RMN-ÉS et d'IRTF et de synthétiser des nanoparticules (NPs) à base de fullerène au pouvoir potentiellement antibiotique. Les membranes cellulaires sont composées majoritairement de phospholipides, et des mélanges de dipalmitoyl-phosphatidylcholine et -phosphatidylglycérol (DPPC/DPPG) et de DPPC/Cholestérol sont utilisés pour imiter respectivement les membranes de bactéries et d'eucaryotes. Les résultats de spectroscopie de RMN (^{31}P et 2H) de l'état solide et d'IRTF présentés dans ce travail démontrent une affinité spécifique des fullerénols pour les membranes bactériennes composées du phospholipide anionique DPPG. Selon nos observations, les fullerénols sont solubles dans l'eau et interagiraient sélectivement avec les têtes polaires de la DPPG à l'interface eau/bicouche *via* des ponts-H. Aucun effet similaire n'a été observé pour les membranes modèles de type eucaryotes composées de DPPC/Cholestérol.

Dans une autre section, une méthodologie de synthèse permettant d'introduire en une étape des unités propargyle ou azoture en périphérie du fullerène est détaillée, ainsi que la méthode pour en évaluer le nombre à l'aide de la TGA, de la RMN et de l'ATR. Ensuite, à l'aide de la méthode de réduction de Staudinger sur un précurseur polyazidofullerène, le composé polycationique $C_{60}(OH)_n(OCH_2CH_2NH_3^+Cl^-)_{10}$ est synthétisé. Aussi, l'exploration de la "Click chemistry" nous permet de synthétiser un fulléroglyco "cluster" D-mannosylé contenant sept unités de carbohydrates en périphérie du fullerène. La haute solubilité de ces composés dans les milieux aqueux est démontrée.

En conclusion, à l'aide de la spectroscopie de RMN-ÉS et d'IRTF, nous avons démontré l'effet spécifique des fullerénols sur les membranes modèles de bactéries. Aussi en deuxième partie, nous avons synthétisé des molécules nouvelles à base de fullerène contenant des fonctions ammonium ou des sucres en périphérie du C_{60} . Ces molécules sont fortement solubles dans l'eau. L'ensemble de nos travaux suggère une piste intéressante dans le développement de nouveaux antibiotiques à base de fullerène ayant une spécificité pour les membranes bactériennes de type *E. coli*.

Mots clés: Fullerénol; interactions membrane/nanoparticule; DPPC; DPPG; cholestérol; RMN de l'état solide; phosphore; deutérium; IRTF; bactérie; eucaryote; ponts-H; fulléroglyco "cluster"; polyazidofullerène; fullerène polycationique; TGA; ATR.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Fullerène-Découverte-Structure-Applications

En Angleterre, Kroto et son équipe de chercheurs ont synthétisé et isolé pour la première fois le fullerène (C_{60}) en imitant les conditions interstellaires en laboratoire. Ils ont fabriqué du C_{60} de haute pureté lors d'une expérience où ils ont chauffé du graphite sous vide tout en le bombardant d'énergie à l'aide d'un laser (Kroto et al., 1985). La structure du fullerène (Fig.1.1) est identique à un ballon de soccer et elle est composée de 60 atomes de carbone.

Cette molécule est sphérique et a un diamètre d'environ un nanomètre. Elle est composée de 20 hexagones et de 12 pentagones et possède un total de 30 liaisons double carbone-carbone de type sp^2 (Kroto et al., 1985; Mateo-Alonso et al., 2006). Par des réactions chimiques classiques du type Bingel, Prato et de cyclopropanation (Mateo-Alonso et al., 2006), il est possible de modifier la surface du fullerène dans le but de contrôler ses propriétés chimiques, mécaniques et électroniques.



Figure 1.1: Structure du fullerène (C_{60}).

Les nanoboules sont ainsi “décorées” à l’aide de groupements chimiques plus solubles, adaptés à l’application recherchée (Wilson, 2002; Mateo-Alonso et al., 2006; Hirsch, 2010). L’utilisation la plus courante du fullerène se retrouve dans le domaine de l’électronique (Mateo-Alonso et al., 2006; Hirsch, 2010) car cette molécule est capable d’accepter jusqu’à six électrons π , ce qui génère des courants électriques à travers les liens de la molécule. Quelques exemples d’applications des fullerènes dans l’industrie des nanotechnologies sont regroupés dans le tableau 1.1 (Wilson, 2002; Bosi et al., 2003; Mateo-Alonso et al., 2006; Bakry et al., 2007; Nielsen et al., 2008; Nakamura et Mashino, 2009; Partha et Conyers, 2009; Chawla et al., 2010). L’utilisation des fullerènes en biologie et en nanomédecine a fait son apparition depuis la dernière décennie et ce domaine est approfondi à la prochaine section (1.2).

Tableau 1.1: Exemples d’applications des fullerènes dans l’industrie des nanotechnologies

Industrie	Exemples d’applications
Biologie et médecine	agent thérapeutique, diagnostic, matériel bioactif, agent de contraste (IRM)
Électrochimie	batteries secondaires, cellules de combustion, stockage d’hydrogène
Électronique	condensateur, superconducteur
Matériaux	lubrifiant, polymère, graphite
Optique	cellule solaire, photoélectronique
Autres	additif pour l’acier, carburant pour fusée

1.2 L'utilisation des fullerènes en nanomédecine

Les fullerènes natifs sont reconnus pour leur faible solubilité dans l'eau et pour former des agrégats appelés nano- C_{60} (Fig.1.2). Ils sont insolubles dans les fluides biologiques et toxiques envers les membranes cellulaires (Sayes et al., 2004; Nielsen et al., 2008). Par conséquent, cette caractéristique limite grandement leur utilisation en biologie et en médecine (Partha et Conyers, 2009; Hirsch, 2010).

En "décorant" le fullerène adéquatement avec des fonctionnalités polaires, le fullerène devient soluble dans l'eau, ce qui permet de développer des molécules bioactives ayant des propriétés de ciblage pour des maladies importantes (Bosi et al., 2003; Hirsch, 2010). Par exemple, le fullerène est capable de s'insérer dans la cavité hydrophobe des protéases associées au syndrome de l'immuno-déficience acquise (SIDA) (Bakry et al., 2007). Aussi, ces nanoparticules sont présentement utilisées et étudiées comme inhibiteurs d'enzymes, comme agents anticancéreux, antimicrobiens, anti-Parkinsoniens, anti-Alzheimer et dans le traitement de la maladie de Lou Gehrig notamment (Bosi et al., 2003; Bakry et al., 2007; Nielsen et al., 2008; Nakamura et Mashino, 2009; Partha et Conyers, 2009; Chawla et al., 2010).

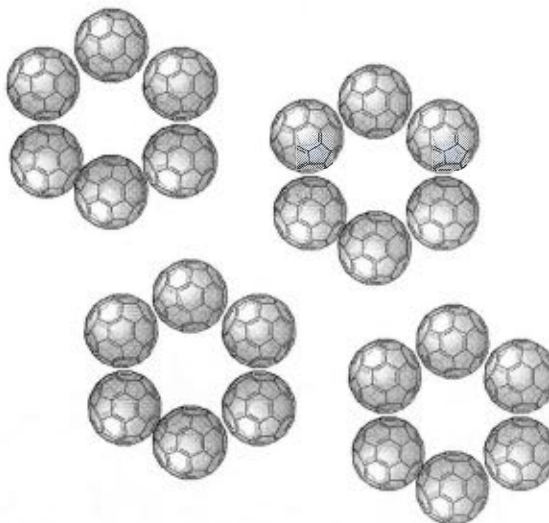
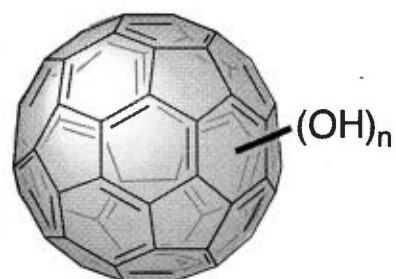


Figure 1.2: Structure du nano- C_{60} .

Jusqu'à ce jour, il a été démontré que les hydroxy et carboxyfullerènes (Fig.1.3) polysubstitués sont très solubles dans les milieux aqueux. Ils sont biocompatibles et montrent une toxicité *in vivo* très faible sur les lignées cellulaires humaines (Sayes et al., 2004; Chen et al., 2005; Nielsen et al., 2008). Aussi, ces nanoparticules à base de fullerène démontrent une activité antibactérienne importante (Mashino et al., 1999; Bosi et al., 2003; Aoshima et al., 2009; Nakamura et Mashino, 2009). Il est reconnu que le C_{60} et ses dérivés peuvent perturber les bicouches lipidiques (Braun et Hirsch, 2000; Spurlin et Gewirth, 2007) par intercalation du C_{60} dans la paroi cellulaire (Bosi et al., 2003; Bakry et al., 2007). La nanoparticule altère les propriétés de perméabilité membranaire et conduit à la mort des cellules ciblées et ce, à des concentrations nanomolaires (Bosi et al., 2003). Selon des études de simulation atomistique (Quiao et al., 2007), la diffusion passive, ou translocation, de la nanoparticule à travers le plasma membranaire de la bactérie serait le mécanisme plausible qui expliquerait l'insertion du fullerénol ($C_{60}(OH)_{20}$) dans les bicouches de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (Nielsen et al., 2008).

En substituant le fullerène à l'aide de groupements fonctionnels polaires comme des petits peptides, des fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN), des sucres et des chaînes de type polyéthylène glycol (PEG) (Bosi et al., 2003), il est possible de modifier le diamètre, le ratio surface/volume, la balance hydrophile/hydrophobe, la charge et la flexibilité de la nanoparticule et de favoriser l'insertion dans les membranes cellulaires (Leroueil et al., 2007; Nakamura et Mashino, 2009; Hirsch, 2010). La découverte de cette nouvelle voie d'action des fullerènes sur les membranes cellulaires a encouragé les groupes de recherche à étudier le potentiel antimicrobien et les effets de ces nanoparticules sur les cellules de bactéries. Ce mécanisme d'action est comparable à celui des peptides antimicrobiens qui brisent les membranes des bactéries (Epand et Vogel, 1999; Hong et Su, 2011).

A



B

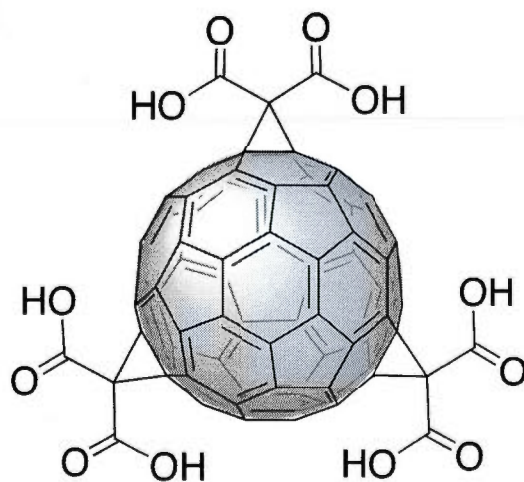


Figure 1.3: (A) Formule générale des hydroxyfullerènes (Kokubo et al., 2008) et (B) structure du tris-carboxy-C₆₀ (C₃) (Sitharaman et al., 2004).

1.3 Problématique de la résistance des bactéries aux médicaments

La résistance aux antibiotiques est la capacité naturelle que possède un micro-organisme (bactérie) à résister aux effets des antibiotiques. La première cause reconnue du phénomène de la résistance provient de mutations génétiques dans la bactérie (Benveniste, 1973; Hawkey, 1998; Tenover, 2006). Dans la nature, les bactéries sont confrontées quotidiennement à leur environnement immédiat et elles ont développé des mécanismes naturels de résistance génétique leur permettant de lutter contre des molécules chimiques envahissantes externes, comme les substances toxiques sécrétées par les plantes et champignons par exemple (Forrest, 1982; Wainwright, 1989). Lorsqu'une bactérie possède plusieurs gènes résistants lui permettant de lutter contre différents types d'antibiotiques, elle se dit "multirésistante" ou communément appelée "super bactérie".

Ces résistances peuvent aussi apparaître contre des molécules synthétiques produites par l'humain. L'utilisation massive d'antibiotiques dans le domaine de la médecine et dans la culture bovine sont les principales causes ayant favorisé l'émergence du phénomène de résistance des bactéries depuis la fin du XX^e siècle (Benveniste, 1973; Hawkey, 1998; Perrière et al., 2001; Singer et al., 2003; Goosens et al., 2005; Mathew et al., 2007). Les premières bactéries résistantes aux antibiotiques ont fait leur apparition dès les années 1940 (Singer et al., 2003). À cette époque, plusieurs antibiotiques étaient découverts régulièrement et mis en marché à un rythme soutenu, limitant ainsi le phénomène d'exposition et de résistance. Au fil des décennies suivantes, l'effet de rareté des nouveaux antibiotiques sur le marché combiné à l'usage excessif et parfois même abusif de ces médicaments par les patients ont favorisé les risques de propagation de "super bactéries" (Singer et al., 2003).

Aujourd'hui, le phénomène a des répercussions importantes au niveau de la santé publique et par conséquent au niveau économique des sociétés humaines (Tenover, 2006). Des études statistiques soulignent qu'en 2004, plus de 2 millions de personnes ont été infectées par des bactéries pathogènes dans les hôpitaux américains, dont 5% des cas ont été fatals. De plus, 70% des bactéries pathogènes retrouvées dans ces hôpitaux sont résistantes à au moins un médicament antibiotique disponible sur le marché (Overbye et Barrett, 2005). Le SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline), un mutant multirésistant, est désormais courant en milieu hospitalier. Aux États-Unis, la moitié des staphylocoques dorés sont résistants contre au moins quatre des principaux antibiotiques disponibles sur le marché (Klevens et al., 2007).

Les bactéries sont capables de s'adapter à la toxicité des antibiotiques grâce à des mutations génétiques et quatre principaux mécanismes (Benveniste, 1973; Hawkey, 1998; Tenover, 2006) sont exploités par les bactéries pour faire face aux antibiotiques commerciaux. Les mécanismes principaux permettent entre autres à la bactérie (1) de modifier l'antibiotique et de le rendre inactif souvent à l'aide d'enzymes, (2) de prévenir l'entrée de l'antibiotique dans la cellule en modifiant ses flux actifs, (3) d'altérer son site d'action par changement structurel et/ou (4) de produire un site d'action et un chemin métabolique alternatif qui permettrait de déjouer l'effet de l'antibiotique.

D'autres mécanismes existent, et un cinquième moins reconnu est basé sur la perturbation structurelle des membranes bactériennes par les antibiotiques (Tenover, 2006). En effet, certains antibiotiques ont la capacité de modifier les propriétés de perméabilité des membranes, causant des fuites dans le contenu des bactéries et par conséquent, leur mort (Braun et Hirsch, 2000; Bosi et al., 2003; Tenover, 2006). Citant le cas de la mélittine, un peptide antimicrobien (Lazarov et al., 2002 et 2005).

1.4 Buts de la recherche

Le développement de nouveaux médicaments antibiotiques est primordial et mise sur l'exploitation de mécanismes d'action vis-à-vis desquels les bactéries n'ont pas encore développé de mécanismes naturels de défense (Bosi et al., 2003; Dobrovolskaia et al., 2008; Nielsen et al., 2008; Nakamura et Mashino, 2009; Partha et Conyer, 2009; Hirsch, 2010). Le but principal de cette recherche est d'étudier l'interaction du fullerénol avec les membranes modèles de cellules de bactéries et d'eucaryotes par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et de la résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN-ÉS) du phosphore et du deutérium (^{31}P et ^2H).

Le deuxième objectif de cette recherche est de développer une méthodologie de synthèse permettant d'introduire des substituants polaires en périphérie d'un cœur fullerène et de créer de nouvelles nanoparticules, au potentiel antibiotique, solubles dans les fluides biologiques. Les nanoparticules polycationiques ont une affinité pour les membranes anioniques retrouvées dans les membranes de bactéries (Leroueil et al., 2007; Salnikov et al., 2009). Aussi, l'introduction de sucres en périphérie du C_{60} permettrait d'augmenter sa solubilité dans les fluides aqueux et d'augmenter son affinité pour les lectines, des récepteurs retrouvés à la surface des cellules de bactéries (Chabre et Roy, 2010).

Combinés, nos travaux ont pour but de fournir des connaissances fondamentales nécessaires afin de développer des molécules bioactives à base de fullerène au mécanisme d'action agissant sur les membranes de bactéries.

1.4.1 Études spectroscopiques des interactions avec les membranes cellulaires modèles

Les mécanismes d'interaction des dérivés hydrosolubles du fullerène avec les membranes biologiques ne sont pas très connus (Spurlin et Gewirth, 2007). Le développement des connaissances fondamentales dans ce domaine est d'une grande importance pour évaluer la toxicité de ces nanoparticules envers les cellules humaines et pour mettre au point de nouveaux antibiotiques plus spécifiques et plus efficaces pour lutter contre les bactéries (D'Rosario et al., 2009). Dans ce contexte, notre recherche porte sur l'évaluation du potentiel antibiotique du fullerénol $C_{60}(OH)_{24}$ (Fig.1.4). Plus spécifiquement, l'effet du fullerénol sur les membranes modèles de bactéries et d'eucaryotes est comparé à l'aide de la résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN-ÉS) et de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Ces travaux sont présentés au Chapitre III.

Les membranes modèles sont composées de phospholipides synthétiques. Leur composition et leur structure sont élaborées à la section suivante (1.4.2). La RMN-ÉS est une technique puissante particulièrement utile pour l'étude des particules exogènes dans un environnement membranaire. En RMN-ÉS, l'observation du noyau approprié, en général du phosphore ou du deutérium selon le cas, permet de sonder les mouvements moléculaires et l'environnement chimique au niveau des têtes polaires et des chaînes acyle des phospholipides, respectivement. En particulier, l'étude du noyau ^{31}P (Seelig, 1978) donne un très bon diagnostic de la rupture et de la réorganisation de la membrane de phospholipides. Aussi, en incorporant des phospholipides ayant des chaînes deutérées dans les membranes modèles, la RMN 2H permet de sonder les déformations structurales de la région hydrophobe de la bicouche (Seelig, 1977; Killian et al., 1986; McConnell et Radhakrishnan, 2006).

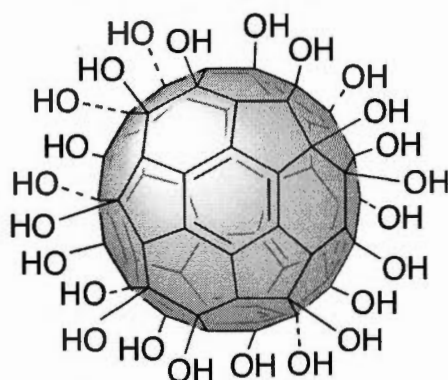


Figure 1.4: Structure simplifiée du fullerénol ($C_{60}(OH)_{24}$).

En complémentarité, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) donne de l'information supplémentaire sur la région hydrophobe de la bicouche *via* l'étude simultanée des elongations asymétriques CH_2 et CD_2 des phospholipides (Mendelsohn et Mantsch, 1986; Mantsch et McElhaney, 1991), ce qui permet de sonder à la fois deux phospholipides contenus dans un même mélange par exemple.

1.4.2 Les membranes modèles : Bactéries/Eucaryotes

Les membranes biologiques sont des assemblages complexes de lipides, de protéines, de cholestérol et de sucres (Fig.1.5). Elles ont un rôle clé dans le transport de matière entre l'intérieur et l'extérieur des cellules vivantes. Les phospholipides qui composent les membranes sont responsables de leur structure et en contact avec l'eau, ils s'organisent sous la forme de bicouches fluides (Singer et Nicholson, 1972; Bloom et Mouritsen, 1995; Seydel, 2002).

La composition des membranes naturelles est trop complexe pour élucider leur structure par spectroscopie de RMN et d'IRTF. L'utilisation de membranes modèles de composition et de structure similaires aux membranes biologiques permet de simplifier l'étude et d'analyser les perturbations au niveau de la bicouche. La composition des membranes de bactéries est beaucoup plus complexe que celles des eucaryotes. En effet, celles de *E. coli* ont la particularité de contenir jusqu'à 20% de phosphatidylglycérol (PG), un phospholipide anionique (Seydel, 2002; Goldfine, 1984). Par conséquent des vésicules multilamellaires composées de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) avec 20 mol% de dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG) seront utilisées pour mimer les membranes bactériennes.

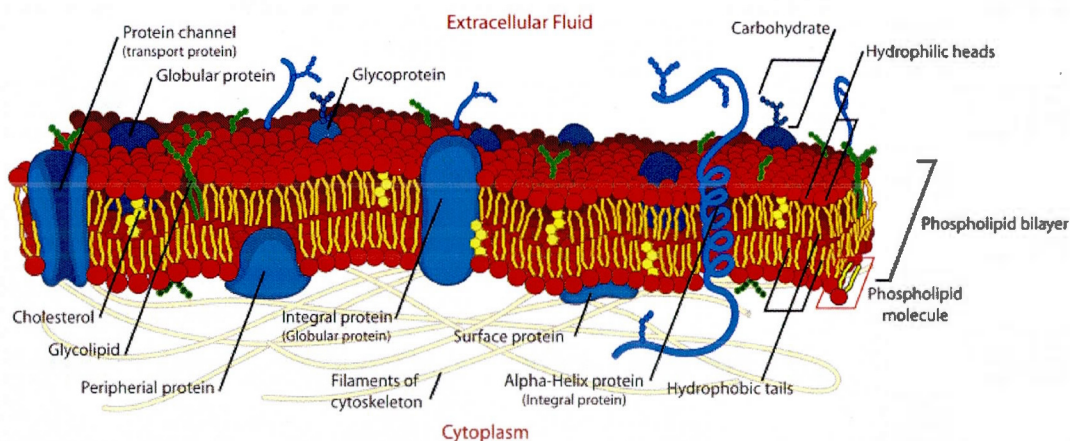


Figure 1.5: Représentation schématique d'une membrane biologique (tirée de Hill, 2008).

Pour vérifier l'affinité préférentielle du fullerénol avec les membranes bactériennes, une comparaison sera faite avec des membranes modèles d'eucaryotes. Pour ce faire, des vésicules composées de DPPC avec 20 mol% de cholestérol sont employées. Les phosphatidylcholines (PC) sont des phospholipides naturels retrouvés jusqu'à 80% dans les cellules des mammifères et leur interaction avec le cholestérol, un constituant essentiel des cellules, est bien documenté (Guo et Hamilton, 1995; McConnell et Radhakrishnan, 2006; Mannock et al., 2010). Les structures des lipides sont détaillées à la Fig. 1.6.

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles. Ils sont composés d'une tête polaire phosphatée et de deux chaînes acyle hydrophobes. Les phospholipides sont insolubles dans l'eau et ont la propriété de s'organiser en vésicules multilamellaires (MLV) constituées de plusieurs bicouches de phospholipides (Fig.1.7) (Seelig, 1977 et 1978). Ces vésicules sont sphériques ou ellipsoïdales tout dépendamment de leur composition chimique et de la température (Pott et Dufourc, 1995). La forme de ces vésicules dépendra aussi de la taille relative des têtes polaires et de la longueur des chaînes acyle des phospholipides (Mouritsen, 2005). Les phospholipides ne sont pas rigides dans la membrane, mais peuvent changer de conformation en réponse à des stimuli externes.

Les mouvements moléculaires à l'intérieur des vésicules sont lents à l'échelle de la RMN en solution, par conséquent l'utilisation de la RMN-ÉS est mieux adaptée pour l'étude de l'organisation et de la dynamique des phospholipides membranaires (Seelig, 1977 et 1978). Les notions de base de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et de la résonance magnétique nucléaire de l'état solide sont élaborées dans le prochain chapitre. Plus précisément, le Chapitre II explique la théorie générale en lien avec l'étude des phospholipides dans les systèmes membranaires.

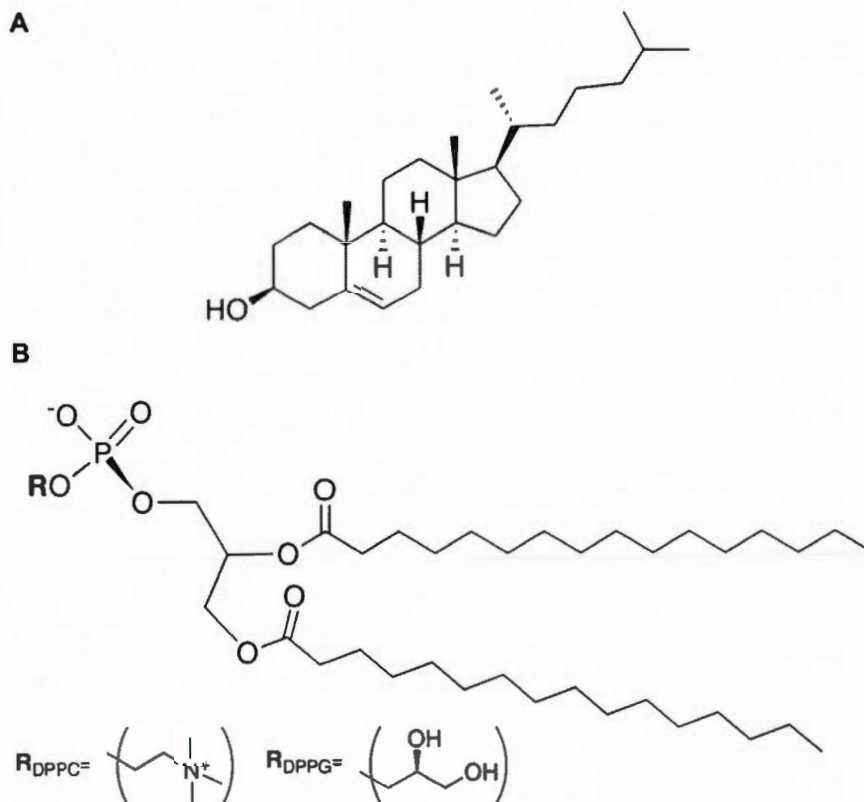


Figure 1.6: Structure (A) du cholestérol et (B) de la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et de la dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG).

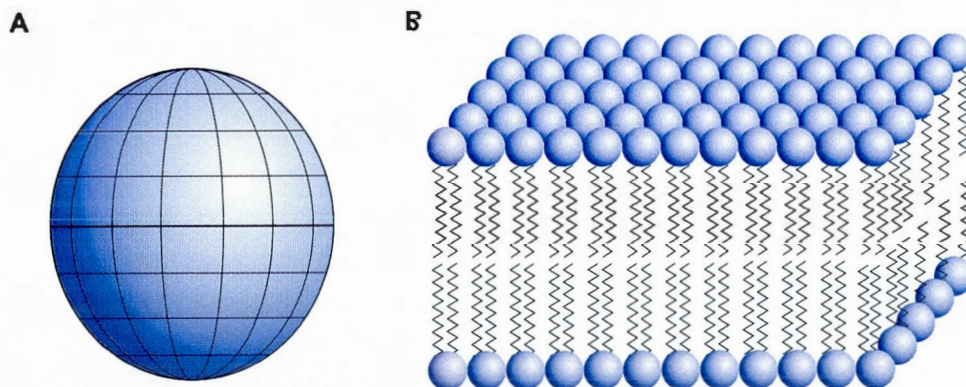


Figure 1.7: Schéma (A) d'une vésicule multilamellaire (MLV) et (B) d'une bicouche fluide de phospholipides.

1.4.3 Synthèse d'agents antimicrobiens bioactifs à base de fullerène

L'utilisation des dérivés du fullerène solubles dans les milieux biologiques est en plein essor dans le domaine de la nanotechnologie. Par conséquent, de nouvelles stratégies de synthèse sont nécessaires dans le but de développer des bibliothèques de molécules bioactives, très utiles pour le développement rapide de nouveaux médicaments (Hajduk et al., 2011). Afin de contrer au phénomène de résistance des bactéries aux antibiotiques, des stratégies thérapeutiques alternatives sont développées et visent à inhiber les interactions lectines-carbohydrates. Les lectines sont une classe de protéines, et de nombreuses maladies comme le cancer ou la fibrose kystique font appel à ses interactions avec les carbohydrates. Ses interactions sont spécifiques et réversibles et impliquent des mécanismes métaboliques comme l'adhésion, la régulation cellulaire et l'apoptose (Chabre et Roy, 2010).

Dans la présente recherche, une méthodologie de synthèse flexible permettant l'introduction systématique de substituants polaires en périphérie du fullerène est élaborée au Chapitre IV. Plus spécifiquement, la réaction classique de formation d'éther de Williamson (Williamson, 1850; Weissberg et al., 2001) nous permet d'introduire un nombre maximal et théorique de 24 substituants en périphérie du fullerène en une étape à partir du bromofullerène ($C_{60}Br_{24}$) ou du fullerénol ($C_{60}(OH)_{24}$), tous deux disponibles commercialement. Aucune méthodologie semblable n'est détaillée dans la littérature scientifique et constitue donc une nouvelle façon élégante de synthétiser des dérivés du fullerénol en introduisant en grand nombre des groupements fonctionnels de type propargyle ou azoture. Ensuite, le nombre d'unités greffées en périphérie est évalué à l'aide de l'analyse thermogravimétrique (TGA) (Goswami et al., 2004; Singh et Goswami, 2011), de la RMN et de l'infrarouge à réflectance totale atténuée (ATR).

Un des objectifs principaux du Chapitre IV est de synthétiser un nouveau composé du type $C_{60}(O-R-NH_3^+Cl^-)_{24}$ dérivé de la famille des fullerénols. Ce composé polycationique peut être préparé par la méthode de réduction de Staudinger (Gololobov et al., 1981; Bräse et al., 2005) à partir du précurseur polyazidofullerène synthétisé (Fig.1.8). Plusieurs macromolécules polycationiques ont une affinité pour les membranes bactériennes anioniques (Leroueil et al., 2007; Salnikov et al., 2009). Entre autre, le fullerène polycationique $C_{60}(NH_3^+)_{12}$ contenant douze fonctions quaternaires en périphérie est une molécule démontrant des propriétés dans le "gene delivery" d'ADN (Sigwalt et al., 2010). Notre modèle de fullerénol polycationique pourrait mimer le mécanisme d'action des peptides antibactériens qui lysent les membranes de bactéries (Hong et Su, 2011). Finalement, l'exploration de la "Click chemistry" (Kolb et al., 2001) nous permet d'envisager la synthèse d'un fullerène polymannosylé de la famille des "sugar balls" (Kato et al., 2007; Chabre et Roy, 2010; Nierengarten et al., 2010).

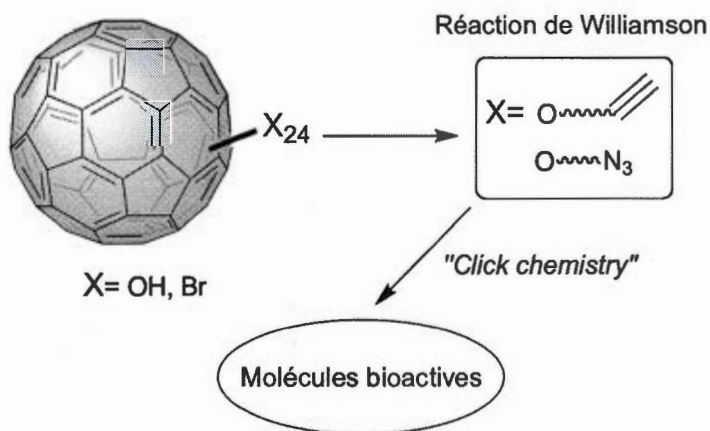


Figure 1.8: Approche synthétique pour le nouveau design de molécules bioactives dérivées de la famille des fullerénols.

CHAPITRE II

ASPECTS THÉORIQUES

2.1 Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge est une technique qui permet l'étude des mouvements des liaisons chimiques en mesurant l'absorption de radiations électromagnétiques d'un composé. L'IRTF est une technique complémentaire à la RMN du ^2H et permet, entre autre, de sonder les mouvements moléculaires aux niveaux des chaînes acyle des phospholipides.

Lorsqu'un échantillon absorbe une radiation électromagnétique de la région du proche et moyen infrarouge ($10\ 000$ à 200 cm^{-1}), l'absorption est convertie en énergie de vibration moléculaire. Ces absorptions sont quantifiées et apparaissent en bandes à des fréquences ou longueurs d'ondes qui dépendent de la masse relative des atomes qui composent le lien chimique, la force de constante et aussi la géométrie du lien (Silverstein et Webster, 1998).

Le spectre infrarouge d'intérêt pour étudier les liaisons chimiques est le résultat des transitions entre les différents niveaux d'énergie à chaque longueur d'onde du spectre électromagnétique, principalement dans la zone du moyen infrarouge (4000 à 400 cm^{-1}). Chaque groupement fonctionnel présent sur une molécule a une élancement caractéristique, ainsi le spectre infrarouge permet d'étudier simultanément les différents types de liens présents sur une molécule.

2.1.1 Élongations principales (étude de phospholipides)

Chaque espèce chimique a un spectre infrarouge unique et les bandes observées correspondent aux différents groupements fonctionnels présents sur la molécule. Les élongations principales observées en infrarouge pour les phospholipides sont détaillées dans le tableau 2.1. Tels qu'illustrés à la figure 1.6, les phospholipides sont des molécules amphiphiles et leur structure comporte une tête polaire et deux chaînes acyle à longueur variable. L'observation des mouvements moléculaires de la zone hydrophobe du phospholipide se fait par la détection des bandes d'élongation asymétrique et symétrique du lien C-H des groupements méthylène sur les chaînes acyle. Les fréquences caractéristiques de ces étirements sont de 2915 et 2850 cm^{-1} respectivement. Le deutérium est un isotope plus lourd que l'hydrogène, par conséquent la bande d'élongation du lien C-D se retrouve à des fréquences de vibration plus basses et les bandes asymétrique et symétrique se retrouvent alors à 2190 et 2080 cm^{-1} . Dans notre étude, la substitution isotopique permet de sonder simultanément les bandes CD_2 de la DPPC- d_{62} (Mendelsohn et Mantsch, 1986; Mantsch et McElhaney, 1991) et CH_2 de la DPPG dans les MLVs de DPPC/DPPG.

Tableau 2.1: Élongations principales des phospholipides en IRTF

Vibrations caractéristiques	Fonction	Fréquence de vibration (cm^{-1})	Attribution sur les phospholipides
C-H ₂ <i>élongation</i>	alcane	2915 (ν_{asy}) 2850 (ν_{sym})	chaînes acyle
C-D ₂ <i>élongation</i>	alcane deutéré	2190 (ν_{asy}) 2080 (ν_{sym})	chaînes acyle
C=O <i>élongation</i>	ester	1735	} têtes polaires
P-O <i>élongation</i>	phosphate	1210	
C-O <i>élongation</i>	ester	1075	

2.1.2 Transition de phase gel-fluide

En présence d'eau, les phospholipides s'organisent sous la forme d'une bicouche (Fig.1.7 et 2.1). La fluidité de la membrane dépend de la température et de la composition chimique des phospholipides. En augmentant la température, les mouvements moléculaires des phospholipides augmentent et la bicouche subit une transition de phase gel à fluide (Fig.2.1). La température de la transition de phase (T_m) est caractéristique pour chaque phospholipide. Par exemple, la T_m de la DPPC est de 41°C (Guo et Hamilton, 1995) et celle de la DPPG est d'environ de 40 à 41°C (Killian et al., 1986). Le changement de conformation trans-gauche des groupements CH_2 des chaînes acyle crée du désordre dans la partie hydrophobe de la bicouche et la fluidité de la membrane augmente. Par conséquent, l'épaisseur de la bicouche dans la phase fluide diminue. Les vibrations internes des chaînes acyle sont particulièrement utiles pour étudier la transition de phase gel-fluide des phospholipides et les changements conformationnels sont observables en IRTF par le déplacement des bandes $\nu_{\text{asy}} \text{CH}_2$, $\nu_{\text{sym}} \text{CH}_2$, $\nu_{\text{asy}} \text{CD}_2$, et $\nu_{\text{sym}} \text{CD}_2$ (Mendelsohn et Mantsch, 1986; Mantsch et McElhaney, 1991).

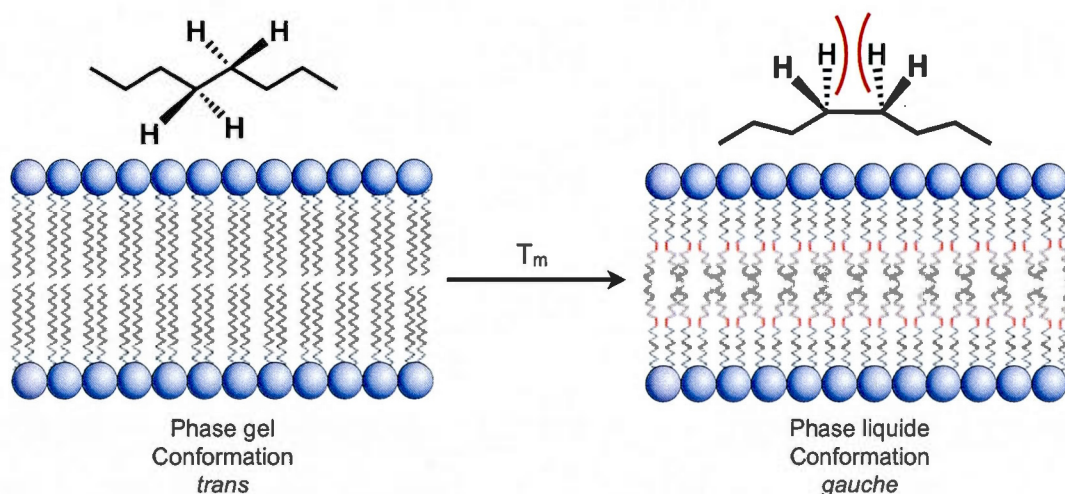


Figure 2.1: Transition de phase gel-fluide des phospholipides.

2.1.3 Phénomène de thermotropisme

La fréquence d'absorption des mouvements des chaînes acyle des phospholipides est dépendante de la température. L'analyse du thermotropisme des phospholipides permet de déterminer leur température de transition de phase. Aux alentours de la T_m , les bandes d'élongations élargissent et se déplacent vers des fréquences plus élevées (Fig.2.2). Le suivi du déplacement des élongations asymétrique et symétrique des groupements méthylène (ou leur équivalent deutéré) avec la température permet de sonder l'acroissement des vitesses de mouvements moléculaires et du nombre d'états conformationnels des chaînes acyle. La présence d'un médicament ou d'une nanoparticule peut induire des changements dans la bicouche et modifier la température de transition de phase gel-fluide déterminée à partir de la courbe de thermotropisme (i.e. ν_{CH_2} ou ν_{CD_2} en fonction de la température) (Mendelsohn et Mantsch, 1986; Mantsch et McElhaney, 1991).

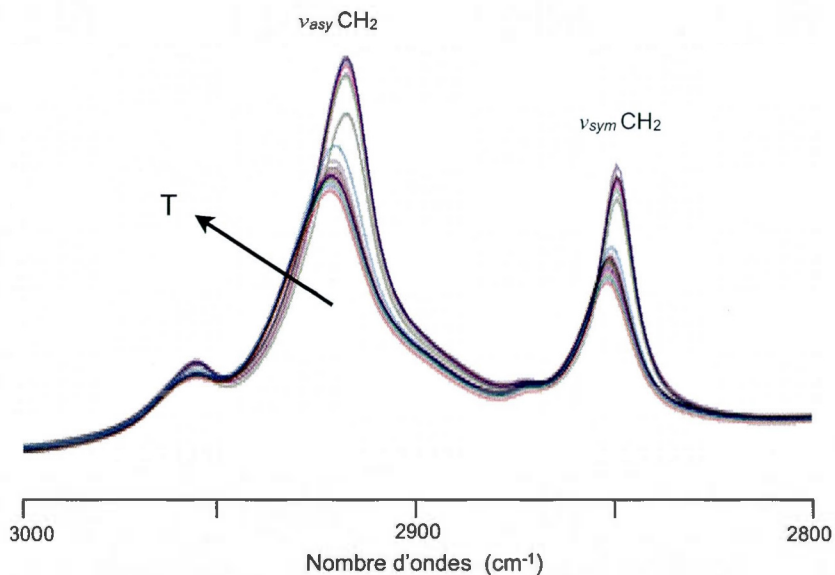


Figure 2.2: Thermotropisme des bandes d'élongation CH_2 asymétrique et symétrique d'un phospholipide.

2.2 Les interactions dominantes en RMN de l'état solide (RMN-ÉS)

En RMN, les spins des noyaux sous l'influence du champ magnétique subissent plusieurs interactions qui sont habituellement moyennées en RMN en solution. Ces interactions sont principalement l'effet Zeeman, l'anisotropie de déplacement chimique (ADC), les couplages scalaire et dipolaire, et l'interaction quadripolaire (Haeberlen, 1976). À l'état solide, les atomes adoptent une structure plus dense et compacte qu'en solution. La proximité entre les éléments augmente les interactions internucléaires, et les mouvements moléculaires de type translation, vibration et rotation sont considérablement ralentis par la "friction" entre les atomes (Evans, 1995). Ainsi, l'ADC, les couplages dipolaire et quadripolaire dominent les spectres en RMN-ÉS. La nature de ces interactions est détaillée dans les prochaines sections.

2.2.1 Effet Zeeman

À l'échelle des mouvements moléculaires lents, l'effet Zeeman provoque la séparation des niveaux d'énergie des différents états de spin lorsqu'un noyau est soumis à un champ magnétique externe B_0 (Zeeman, 1897). En l'absence d'un champ magnétique externe, les états de spin d'un noyau possèdent tous la même énergie. Selon la mécanique quantique, le moment angulaire d'un noyau de spin I possède $2I+1$ états de spin possibles et par conséquent, deux niveaux d'énergie existent pour les noyaux de spin $1/2$ (Fig.2.3) dans le B_0 . C'est la levée de dégénérescence (Effet Zeeman) entre les niveaux d'énergie, et la différence d'énergie qui sépare les états de spin (ΔE) est exprimée par l'équation suivante:

$$\Delta E = h\nu = \gamma h B_0 / 2\pi \quad (2.1)$$

où h est la constante de Planck, ν correspond à la fréquence de Larmor, γ est le rapport gyromagnétique du noyau et B_0 , la force du champ magnétique. Le signal observé en RMN dépend de la différence de population des spins entre les niveaux d'énergie. Il est obtenu suite à une impulsion de RF à la fréquence de Larmor du noyau étudié qui provoque des transitions entre les niveaux d'énergie adjacents.

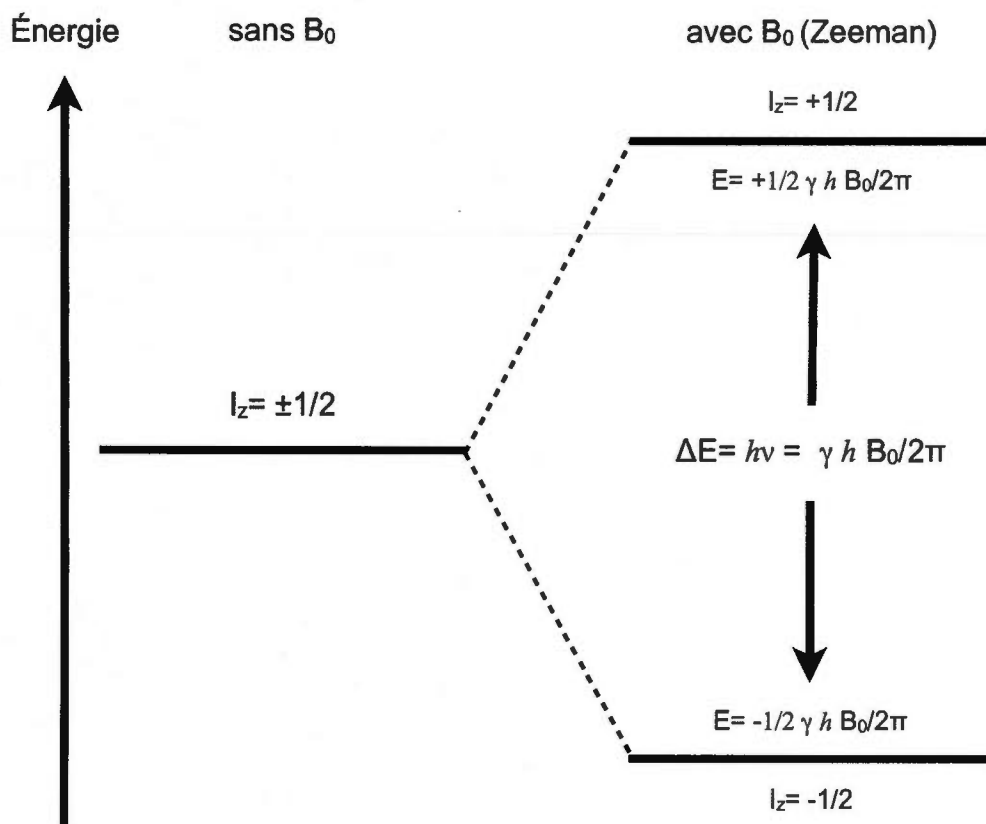


Figure 2.3: Diagramme des niveaux d'énergie d'un noyau de spin 1/2 sous l'influence de l'effet Zeeman (*tiré de Marcotte, 2008*).

2.2.2 Anisotropie de déplacement chimique

La fréquence de résonance d'un noyau dépend de son environnement chimique. Autour du noyau, le nuage électronique n'est pas homogène et le déplacement chimique dépend de son orientation dans le champ magnétique (Fig.2.4). L'ADC est également dépendante de l'environnement électronique local autour du noyau. Les électrons en mouvement dans le nuage électronique induisent un petit champ magnétique local (B_i) qui s'oppose au champ magnétique B_0 (effet de blindage). Le blindage électronique a pour effet de diminuer l'intensité du champ magnétique externe perçu par le noyau (B_{eff}), par conséquent le noyau aura une fréquence de résonance effective (ν_{eff}) spécifique à son environnement (Pochapsky, 2007):

$$\nu_{eff} = (1-\sigma) \gamma/2\pi * B_0 = \gamma/2\pi * B_{eff} \quad (2.2)$$

où σ est le paramètre d'écran chimique et γ est le rapport gyromagnétique du noyau étudié. Comme nous le verrons dans la section 2.3.1, les paramètres d'anisotropie d'un spectre de RMN ^{31}P de phospholipides sont très utiles pour la détermination de la structure et l'étude de la dynamique de la membrane et donnent accès à une source d'informations structurales sur la nature des liens qui relient le noyau étudié et sur celle des groupements d'atomes voisins.

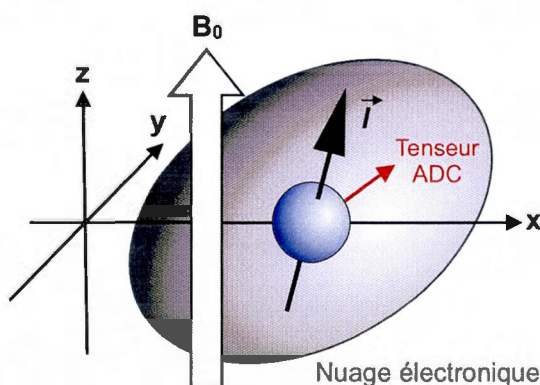


Figure 2.4: Anisotropie de déplacement chimique.

2.2.3 Couplage dipolaire

Le couplage dipolaire provient de l'interaction des dipôles magnétiques ($\vec{\mu}$ et $\vec{\mu}$) de deux noyaux à travers l'espace (Fig.2.5). Le spin d'un noyau peut subir l'influence du spin des noyaux voisins qui génère un champ magnétique local. L'interaction entre deux spins provoque un éclatement dipolaire observable sur le spectre de RMN par une division des signaux (Pochapsky, 2007).

L'énergie du couplage dipolaire (Éq.2.3) dépend du moment magnétique $\vec{\mu}$ de la distance entre les noyaux et de leur orientation relative (θ) avec le champ magnétique externe B_0 (Fig.2.5). Par conséquent, les couplages dipolaires renferment beaucoup d'informations structurales concernant les conformations moléculaires et les distances internucléaires.

$$E_d = \frac{\mu^2}{(r_{12})^3} (3\cos^2 \theta - 1) \quad (2.3)$$

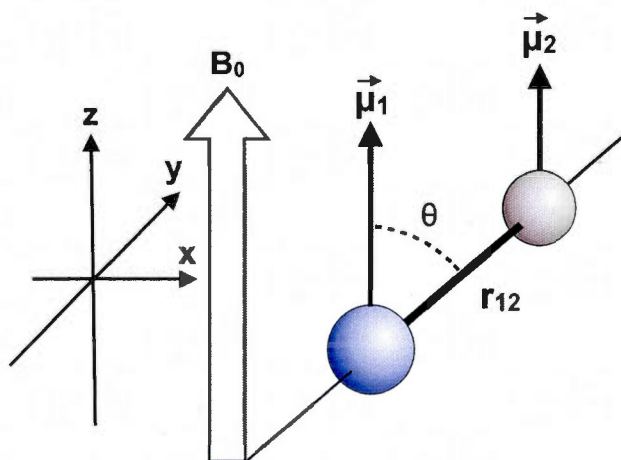


Figure 2.5: Couplage dipolaire entre deux noyaux.

2.2.4 Couplage quadripolaire

Pour les noyaux dont le spin est égal ou supérieur à un comme le deutérium (spin=1), la distribution des charges autour du noyau est non uniforme et en présence d'un champ magnétique externe B_0 , un quadripôle électrique est induit. L'interaction entre les quadripôles électriques et les gradients de champ causés par les liens électroniques avoisinants modifie les niveaux d'énergie magnétique et provoque deux transitions possibles avec des niveaux d'énergie non équivalents.

Sur les spectres de RMN, l'apparition d'un doublet est observée. La figure 2.6 illustre l'effet quadripolaire sur la levée de dégénérescence des transitions d'un noyau de spin 1 exposé à B_0 (effet Zeeman). La valeur de l'écart quadripolaire $\Delta\nu_Q$ est donnée par l'équation suivante:

$$\Delta\nu_Q(\theta) = 3/4 A_Q (3\cos^2 \theta - 1) * S_{CD} \quad (2.4)$$

où θ est l'angle de magnétisation, A_Q , la constante de couplage quadripolaire et S_{CD} le paramètre d'ordre du lien (C-D). A_Q est la mesure de la force de l'interaction quadripolaire pour les groupements CD_2 et sa valeur nominale est de 168 kHz pour un lien C-D retrouvé dans les chaînes acyle d'un phospholipide (Burnett et Muller, 1971).

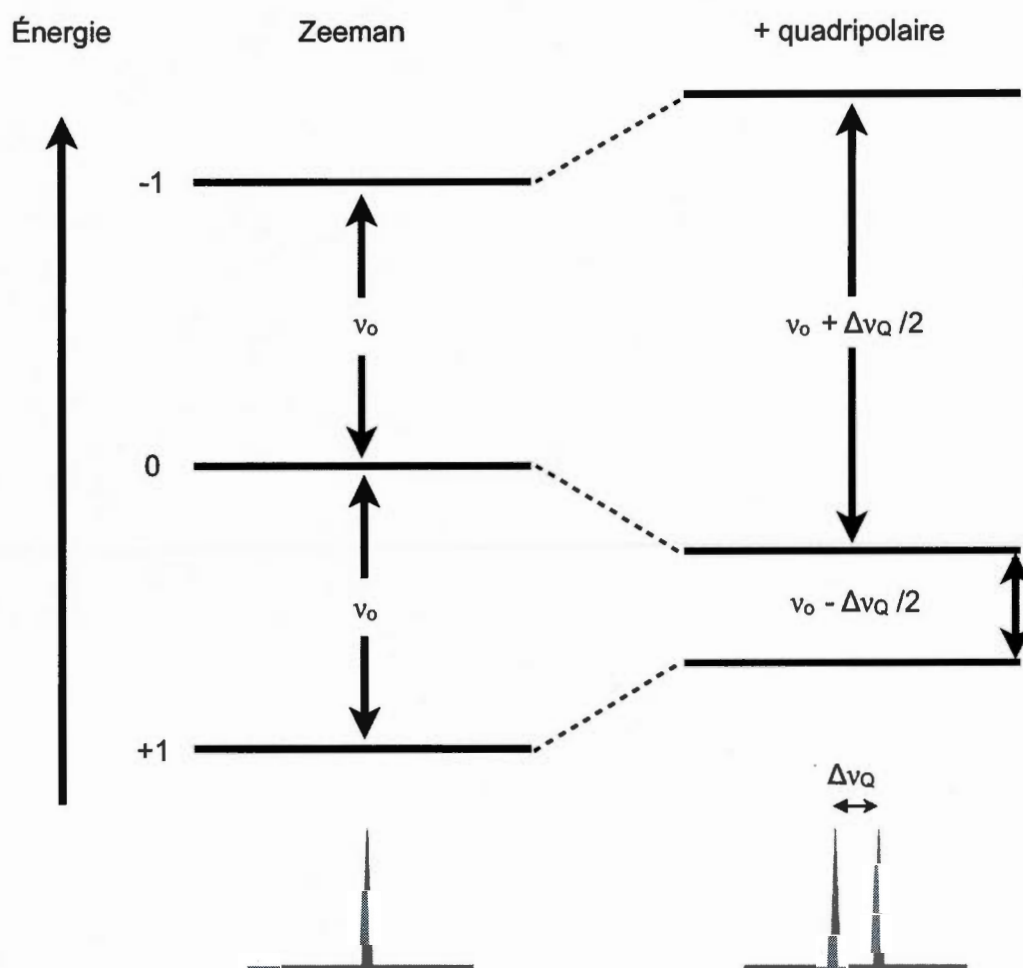


Figure 2.6: Diagramme des niveaux d'énergie (figure du haut) et spectres théoriques (figure du bas) d'un noyau de spin 1 sous l'influence de l'effet Zeeman et de l'effet quadripolaire (tiré de Marcotte, 2008).

2.3 RMN et étude des systèmes phospholipides/membranes

2.3.1 RMN du ^{31}P statique/MAS

Le phosphore-31 contenu dans les têtes polaires des phospholipides est observable par spectroscopie de RMN. En effet, le phosphore a un spin de 1/2, son abondance naturelle est de 100% et son rapport gyromagnétique est élevé ($10,83 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$). Par conséquent, la RMN du phosphore est une technique très sensible pour la détection des mouvements et de l'environnement des têtes polaires dans les bicouches de phospholipides (Seelig et Seelig, 1980). En RMN statique du ^{31}P , c'est l'anisotropie de déplacement chimique qui domine le spectre. Le couplage dipolaire ^{31}P - ^1H est aussi observable et a tendance à élargir les spectres. Ce couplage est cependant partiellement moyenné par la rotation des phospholipides autour de leur axe de rotation, et il est possible de le supprimer par découplage des protons pendant l'acquisition (Seelig, 1978).

Un *spectre de poudre* de spins non orientés (Fig.2.7) rend compte de l'anisotropie de déplacement chimique autour du noyau. Toutes les orientations du tenseur d'ADC par rapport à B_0 ont une fréquence de résonance caractéristique. L'équation de fréquence (ω) peut s'exprimer ainsi pour un spin 1/2 (Haeberlen, 1976):

$$\omega \text{ (Hz)} = \gamma B_0 \left[\delta_{\text{iso}} + \delta \frac{(3\cos^2\beta - 1)}{2} - \eta \frac{(\sin^2\beta \cos 2\alpha)}{2} \right] \quad (2.5)$$

où ω la fréquence de résonance, γ est le rapport gyromagnétique, B_0 le champ magnétique, δ_{iso} le déplacement chimique isotrope, δ le déplacement chimique de référence, η le paramètre d'asymétrie, et où les *angles α et β décrivent l'orientation du tenseur d'ADC dans le B_0 .*

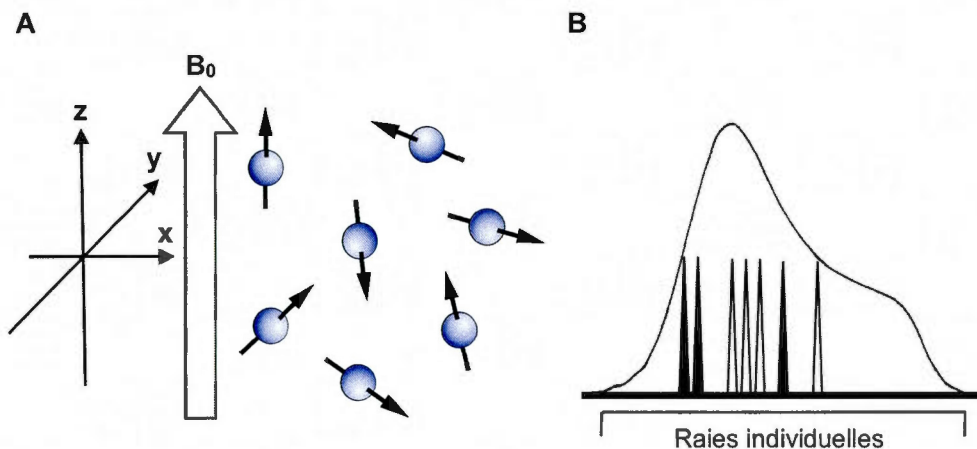


Figure 2.7: (A) Distribution de spins 1/2 non orientés et (B) spectre de poudre (*tirés de Marcotte, 2008*).

L'intensité du spectre de RMN est proportionnelle à la distribution d'orientation des spins dans le B_0 , et dans un échantillon de poudre de spins non orientés, cette distribution est sphérique. Il est possible de schématiser toutes les positions relatives du phospholipide dans le champ magnétique à l'aide d'une sphère et d'intégrer α et β - les angles du tenseur d'ADC dans le B_0 (Fig.2.8) - dans l'équation de fréquence (Éq.2.5). En RMN-ÉS, les spectres de poudre des phospholipides non hydratés (Fig.2.7B)(Seelig, 1978) sont larges et montrent un maximum d'intensité à une orientation de 90° par rapport au champ magnétique B_0 . Le minimum d'intensité sur le spectre représente la zone où les spins sont orientés à 0° .

Pour une vésicule de phospholipides, la forme de la distribution sphérique varie en fonction de la température et de la composition chimique (Pott et Dufourc, 1995) et peut se déformer. Pour une vésicule ellipsoïdale, la distribution des orientations du tenseur d'ADC dans le champ magnétique n'est plus sphérique et l'équation de fréquence (Éq.2.5) telle que vue précédemment ne peut plus dépendre uniquement de α et β , et par conséquent n'est plus applicable. Ce cas particulier ne sera pas approfondi dans ce chapitre.

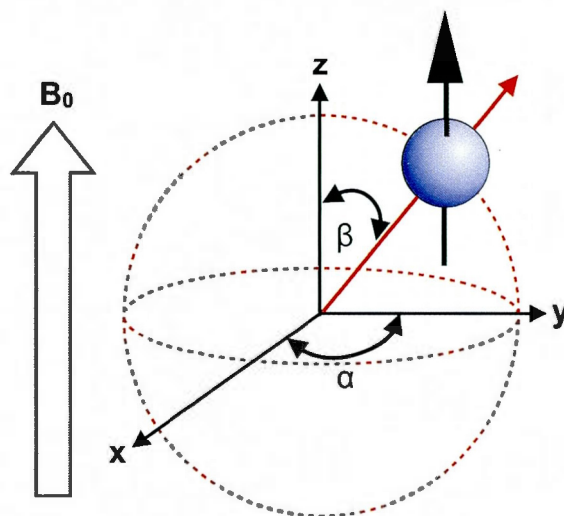


Figure 2.8: Distribution de spins 1/2 sur une sphère.

En milieu hydraté, les phospholipides contenus dans les membranes tournent rapidement autour de leur axe longitudinal et le spectre obtenu est de type *symétrie cylindrique* (Fig.2.9). Le spectre d'une vésicule multilamellaire sphérique de phospholipides hydratés montre quelques différences comparativement au spectre de poudre d'un échantillon sec. Ces différences s'expliquent par une dynamique différente des mouvements moléculaires des phospholipides dans la bicouche (Seelig, 1978). En effet, la présence d'eau permet la rotation rapide des phospholipides autour de leur axe longitudinal qui est perpendiculaire à l'interface eau-bicouche (Fig.2.9). La moyenne des composantes en X et Y du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique dans le plan de la membrane se simplifie en une seule composante perpendiculaire à l'axe de rotation (σ_{\perp}). La composante σ_{\parallel} est parallèle à B_0 . La forme géométrique décrite par le tracé du tenseur d'ADC en rotation autour de l'axe de rotation est celle d'un cylindre.

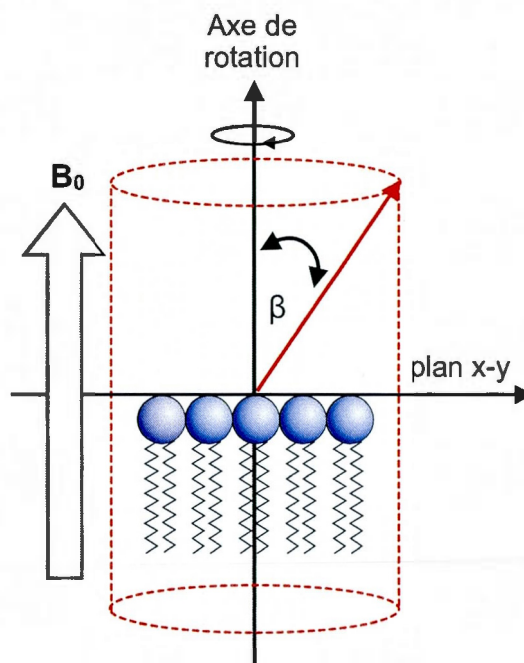


Figure 2.9: Distribution de symétrie cylindrique.

La fréquence de résonance caractéristique des différentes orientations du tenseur d'ADC dans le champ magnétique est décrite par une équation de type symétrie cylindrique où le paramètre d'asymétrie η de l'équation 2.5 est nul. L'équation de fréquence du spectre de RMN se simplifie et devient dépendante de β seulement, l'angle du tenseur d'ADC formé avec B_0 :

$$\omega = \gamma B_0 [\delta_{iso} + \delta (3\cos^2 \beta - 1)/2] \quad (2.6)$$

En RMN du ^{31}P , toutes les orientations des phospholipides dans le champ magnétique (Fig.2.10) ont une fréquence de résonance unique et décrivent un angle θ dans le B_0 . Le spectre se caractérise par l'anisotropie de déplacement chimique ($\Delta\sigma$) et par le déplacement isotrope (σ_{iso}), mesurables directement sur les spectres de RMN (Fig.2.10). Ces deux paramètres sont reliés par la notation de Seelig (Seelig, 1978):

$$\Delta\sigma = \sigma_{//} - \sigma_{\perp} \quad (2.7)$$

$$\sigma_{iso} = 1/3 (\sigma_{//} + 2\sigma_{\perp}) \quad (2.8)$$

où $\sigma_{//}$ et σ_{\perp} sont les déplacements chimiques correspondants aux orientations parallèle (0°) et perpendiculaire (90°) dans le champ magnétique. Ces expressions peuvent être réarrangées pour obtenir:

$$\Delta\sigma = 3(\sigma_{iso} - \sigma_{\perp}) \quad (2.9)$$

où σ_{iso} est le déplacement isotrope déterminé directement à partir du spectre de RMN obtenu à la rotation par l'angle magique (Fig.2.11), tandis que la valeur σ_{\perp} correspond au déplacement chimique du pic à 90° mesuré à une intensité de 90% du signal (Fig.2.10) (Picard et al., 1999). Dans le cas de vésicules multilamellaires sphériques, un changement des paramètres d'anisotropie fournit beaucoup d'informations sur la dynamique au niveau des têtes polaires des phospholipides, sur la phase lipidique de la bicouche et sur l'organisation des phospholipides dans les membranes modèles

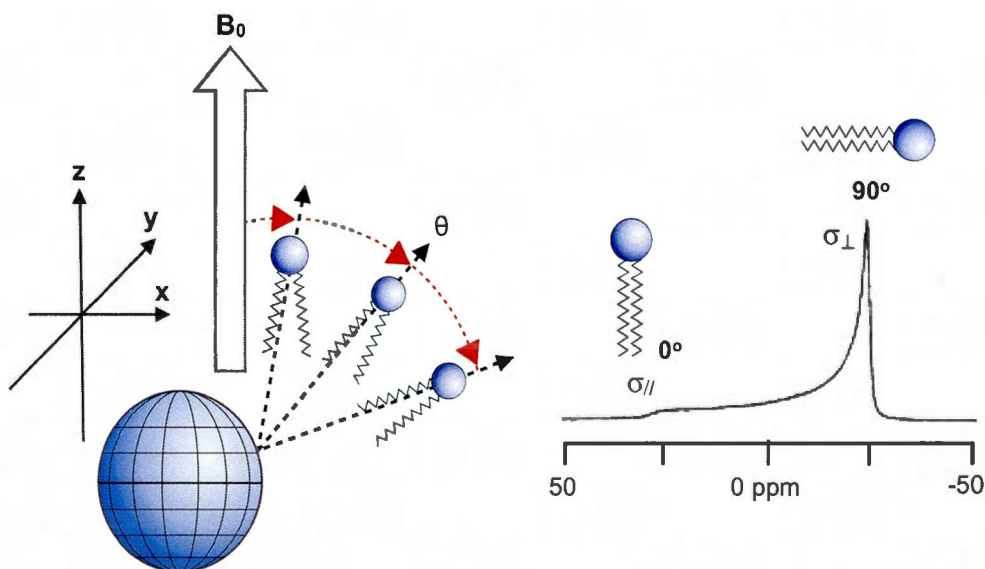


Figure 2.10: Spectre de RMN ^{31}P statique de phospholipides dans une vésicule multilamellaire (MLV).

L'ADC est reliée à la fréquence de résonance par l'équation 2.6, et les mouvements rapides des phospholipides contribuent à diminuer la valeur des paramètres d'ADC. Aussi, lorsqu'un échantillon tourne rapidement sur un axe de rotation orienté à un angle $\beta=54,7^\circ$ dans le B_0 (Fig.2.11), la composante $(3\cos^2 \beta-1)$ de l'équation 2.6 s'annule (égale à zéro) et le spectre de RMN-ÉS se simplifie en une série de raies fines dont le signal majoritaire représente le déplacement chimique isotrope (σ_{iso}) (Hackerborn et al., 1978). Pour moyennner toutes les interactions anisotropes, l'échantillon doit tourner assez rapidement à une vitesse de rotation de l'ordre des kHz. L'annulation complète des interactions dipolaire et quadripolaire est possible quand la vitesse de rotation est supérieure à la fréquence caractéristique de l'interaction. Cette technique s'appelle la rotation à l'angle magique (*magic angle spinning-MAS*). Le changement de fréquence isotrope (σ_{iso}) fournit de l'information sur l'environnement électronique (blindage/déblindage) autour du noyau de phosphore et la largeur de bande, sur le degré de perturbation des bicouches de phospholipides.

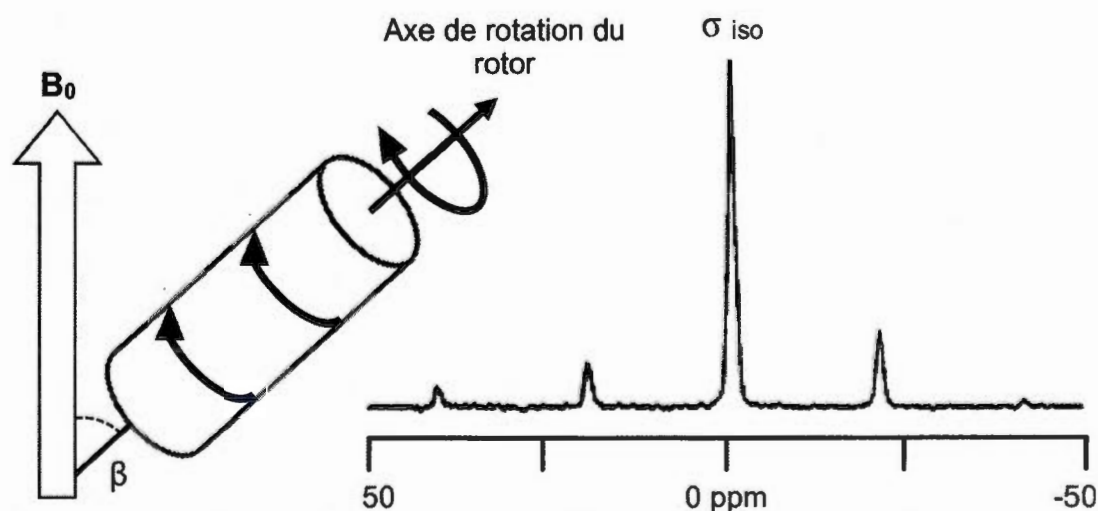


Figure 2.11: Spectre de RMN ^{31}P d'un phospholipide avec la technique de la rotation à l'angle magique.

2.3.2 RMN du ^2H (deutérium)

Le rapport gyromagnétique (γ) du deutérium est de $4,11 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$ et son abondance naturelle est faible (0,015%), par conséquent ce noyau est peu sensible pour les études de RMN. Le marquage isotopique permet donc d'enrichir les chaînes acyle des phospholipides et ainsi, les régions hydrophobes des membranes modèles peuvent être étudiées par RMN ^2H (Fig.2.12) (Seelig, 1977; Killian et al., 1986; McConnell et Radhakrishnan, 2006). Le deutérium est un noyau quadripolaire de $\text{spin}=1$ et les spectres de RMN ^2H des phospholipides sont dominés par l'interaction des quadripôles électriques dans le champ magnétique (section 2.2.4).

La distance observée entre les deux signaux en RMN ^2H correspond à l'écart quadripolaire ($\Delta\nu_Q$) mesuré en kHz (Fig.2.6 et Éq.2.4). La valeur de $\Delta\nu_Q$ dépend de l'angle de magnétisation θ entre le lien C-D et le champ magnétique externe (B_0) (Fig.2.12 et Éq.2.4). Compte tenu du paramètre d'ordre S_{CD} qui reflète l'ordre du lien C-D₂, la valeur de $\Delta\nu_Q$ est différente pour les groupements méthyle CD₃ et méthylène CD₂ (Fig.2.13) et en conséquence, la valeur de $\Delta\nu_Q$ est plus élevée pour les régions de mouvements moléculaires lents. L'augmentation du désordre favorisant un plus grand nombre de conformères gauches, l'augmentation de la fluidité de la membrane et la présence de mouvements rapides au niveau des chaînes, sont des facteurs qui contribuent à diminuer la valeur de $\Delta\nu_Q$.

Les groupements CD₃ terminaux en bout de chaînes ont plus de liberté de mouvement que les groupements CD₂ de la région "plateau" situés plus près des têtes polaires des phospholipides. Par conséquent, leur valeur de $\Delta\nu_Q$ est plus faible. Les spectres de RMN ^2H de phospholipides dans les phases gel et fluide sont illustrés à la figure 2.13. L'augmentation de la température et la transition de phase gel-fluide diminuent les valeurs des écarts quadripolaires, par conséquent les spectres sont plus larges dans la phase gel où les mouvements moléculaires des phospholipides sont plus lents. En RMN-ÉS, donc, l'éclatement quadripolaire donne de l'information sur l'orientation et la dynamique des chaînes acyle des

de phospholipides. Par conséquent, il est possible d'étudier le mécanisme d'interaction d'un médicament avec une membrane cellulaire modèle. Les contraintes appliquées à la membrane par la présence d'une nanoparticule, par exemple, peuvent créer de l'ordre ou du désordre conformationnel et affecteront la valeur de $\Delta\nu_Q$ mesurée.

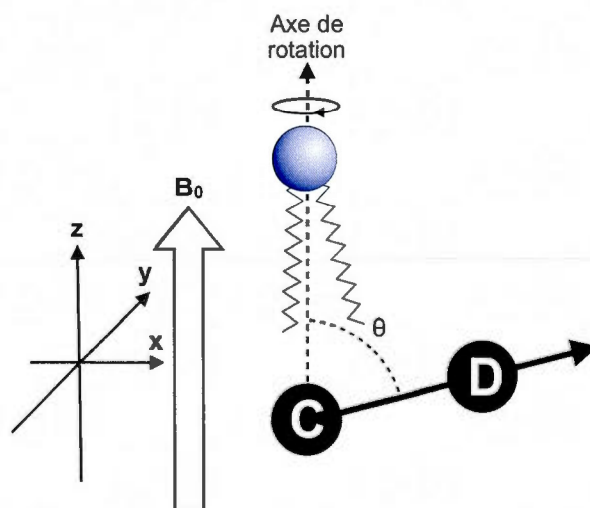


Figure 2.12: Représentation des liens C-D d'un phospholipide deutéré orienté dans le B_0 .

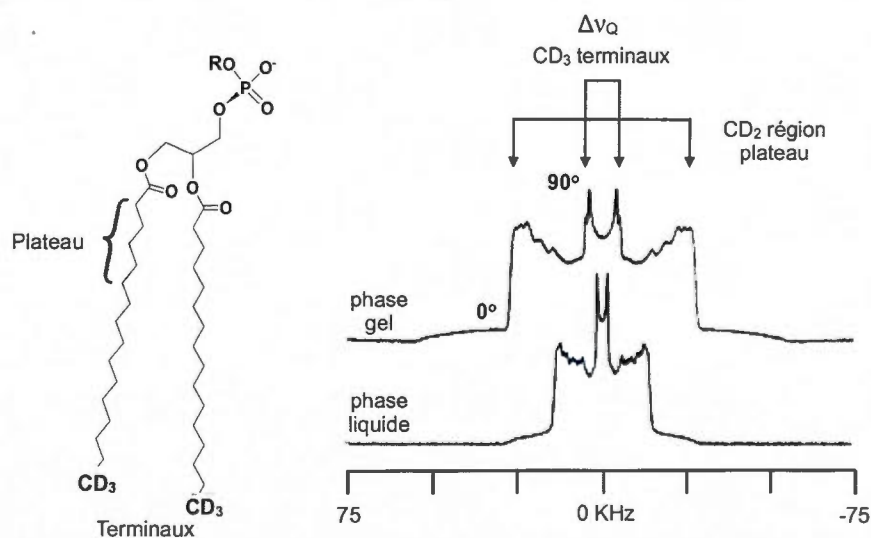


Figure 2.13: Structure et spectres de RMN ^2H de phospholipides deutérés dans une vésicule multilamellaire.

CHAPITRE III

COMPARATIVE STUDY OF THE INTERACTION OF FULLERENOL NANOPARTICLES WITH EUKARYOTIC AND BACTERIAL MODEL MEMBRANES USING SOLID-STATE NMR AND FTIR SPECTROSCOPY

Patrick P. Brisebois • Alexandre A. Arnold • Yoann M. Chabre •
René Roy • Isabelle Marcotte*

Université du Québec à Montréal
Department of Chemistry, Pharmaqam/NanoQAM
P.O. Box 8888, Downtown Station
Montréal, QC, Canada (H3P 3P8)

European Biophysics Journal (2012) 41:535-544

Submitted: January 15th 2012; Accepted: March 12th 2012
Published Online: April 15th 2012

DOI 10.1007/s00249-012-0809-5

CONTRIBUTION ET DÉCLARATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL

Je suis le premier auteur de cet article et j'ai contribué à environ 55% de la rédaction de ce chapitre en anglais, l'autre 45% de la rédaction est attribué à ma directrice de recherche, Isabelle Marcotte, et à Alexandre Arnold, chercheur post-doctoral, qui ont contribué énormément au niveau de la discussion, de l'argumentation scientifique et de la qualité linguistique de ce Chapitre III. Plus précisément, j'ai réalisé toutes les expériences de laboratoire, compilé tous les résultats, traité toutes les données de RMN, effectué 95% de la recherche bibliographique, j'ai contribué grandement à l'écriture de toutes les sections et à l'interprétation des résultats, ayant écrit la première version intégrale de ce manuscrit et réalisé toutes les figures et les tableaux de la section résultats. Je tiens à mentionner que j'ai réalisé toutes les expériences et le traitement de données de RMN sous la supervision du Dr Alexandre Arnold.

RÉSUMÉ

Les fullerènes natifs sont reconnus pour leur faible solubilité dans l'eau et par conséquent, pour former des agrégats toxiques pour les membranes cellulaires, limitant leur utilisation dans le domaine de la nanomédecine. Au contraire, les hydroxyfullerènes sont très solubles dans les milieux aqueux. Ils sont biocompatibles et démontrent une toxicité *in vivo* très faible sur les lignées cellulaires humaines. Les mécanismes d'interaction entre ces nanoparticules hydrophiles et les membranes biologiques sont très peu connus. Le but principal de cette recherche est de vérifier l'effet du fullerénol sur les membranes cellulaires modèles de bactéries et d'eucaryotes à l'aide de la spectroscopie de RMN-ÉS (^{31}P et ^2H) et d'IRTF. Des mélanges de dipalmitoyl-phosphatidylcholine et -phosphatidylglycérol (DPPC/DPPG) et de DPPC/Cholestérol sont utilisés pour mimer respectivement les membranes bactériennes eucaryotiques. Les résultats démontrent une faible affinité du fullerénol pour les membranes composées de DPPC/Cholestérol, mais une interaction claire pour les membranes modèles de bactéries. Une affinité préférentielle du fullerénol pour le phospholipide anionique DPPG est observée dans le mélange DPPC/DPPG. Nos observations suggèrent que les fullerénols demeurent à l'interface eau-bicouche des membranes d'eucaryotes et que la présence de groupements polaires hydroxy de la DPPG à la surface de la bicouche joue un rôle clé dans l'interaction du fullerénol avec les membranes. Les ponts hydrogène du fullerénol avec les groupements OH de la DPPG sont fort probablement responsables de la ségrégation des phospholipides observée dans la bicouche de phospholipides. De plus, le positionnement des NPs dans la région polaire de la DPPG provoque une perturbation des chaînes acyle et une augmentation de la fluidité de la membrane. L'interaction préférentielle du fullerénol avec un phospholipide anionique contenu exclusivement dans les membranes de bactéries est d'un grand intérêt pour le design de nouveaux antibiotiques.

3.1 Abstract

Native fullerene is notoriously insoluble in water and forms aggregates toxic to cell membranes, thus limiting its use in nanomedicine. In contrast, water-soluble fulleranol is compatible with biological systems and shows low *in vivo* toxicity on human cell lines. The interaction mechanism between these hydrophilic nanoparticles and biological membranes is however not well understood. Therefore in this work, the effect of fulleranol on model eukaryotic and bacterial membranes was investigated using ^{31}P - and ^2H solid-state NMR as well as FTIR spectroscopy. DPPC/cholesterol and DPPC/DPPG bilayers were used to mimic eukaryotic and bacterial cell membranes, respectively. Our results show low affinity of fulleranol for DPPC/cholesterol membranes but a clear interaction with model bacterial membranes. A preferential affinity of fulleranol for the anionic phospholipids DPPG in DPPC/DPPG is also observed. Our data suggest that fulleranol remains at the water/bilayer interface of eukaryote-like membranes. They also indicate that the presence of a polar group such as DPPG's hydroxyl moiety at the bilayer surface plays a key role in the interaction of fulleranol with membranes. Hydrogen bonding of fulleranol nanoparticles with DPPGs' OH groups is most likely responsible for inducing lipid segregation in the lipid bilayer. Moreover, the location of the nanoparticles in the polar region of DPPG-rich regions appears to disturb the acyl chain packing and increase the membrane fluidity. The preferential interaction of fulleranol with lipids mostly found in bacterial membranes is of great interest for the design of new antibiotics.

3.2 Introduction

Fullerene (C_{60}) is a spherical molecule containing 60 carbon atoms and 30 double conjugated bonds, which has a diameter of about 1 nanometer. Since its discovery (Kroto et al., 1985), fullerene's applications encompass several technological fields such as biosensors, cosmetics, drug delivery systems, electronics, lubricants, polymer fillers and nanomedicine (Wilson, 2002; Bosi et al., 2003; Nakamura and Mashino, 2009; Partha and Conyers, 2009). The solubility, size, and charge of fullerene can be modulated by chemical modifications and, thus, create novel nanoparticles (NPs) with specific chemical, structural, mechanical and electronic properties (Wilson, 2002; Mateo-Alonso et al., 2006; Hirsch, 2010).

In water, fullerene is poorly soluble and forms aggregates that perturb human cell membranes (Sayes et al., 2004; Nielsen et al., 2008; Partha and Conyers, 2009). By changing their surface chemistry (Hirsch, 2010), fullerene NPs become attractive for several biological applications and are currently used and investigated as effective anti-HIV, anti-tumor, and antimicrobial agents, as well as enzyme inhibitors (Bosi et al., 2003; Bakry et al., 2007; Nielsen et al., 2008; Nakamura and Mashino, 2009; Partha and Conyers, 2009). So far, it has been shown that water-soluble fullerene derivatives - namely carboxylated and hydroxylated C_{60} - have antibiotic activity (Mashino et al., 1999; Bosi et al., 2003; Aoshima et al., 2009; Nakamura and Mashino 2009) and induce low toxicity and fast excretion *in vivo* in mice and rats as compared to native fullerene (Nielsen et al., 2008 and references therein). The low toxicity of hydroxylated C_{60} was also demonstrated *in vitro* using different cell lines such as human dermal fibroblasts and liver carcinoma cells (Sayes et al., 2004) as reviewed by Nielsen et al., (2008). The *in vitro* toxicity is usually related to the formation of ROS (reactive oxygen species) causing membrane cell damage. Nevertheless, it is well recognized that fullerene and some of its derivatives are able to disrupt lipid bilayers (Braun and Hirsch, 2000; Bosi et al., 2003; Spurlin and Gewirth, 2007). For example, by intercalation into the microbial cell walls, fullerene and fullerene-based NPs can alter the membrane permeability and cause cell death at nanomolar concentrations (Bosi et al., 2003). Using atomistic

simulations, Qiao et al. (2007) showed that $(C_{60}(OH)_{20})$ nanoparticles tend to remain on the membrane surface but can slowly passively diffuse into dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers.

Size, charge, as well as flexibility are important factors to investigate in the design of bioactive NPs because they can modulate their insertion into cell membranes (Bakry et al., 2007; Leroueil et al., 2007; Nakamura and Mashino, 2009; Hirsch, 2010). Only little is known of the interaction mechanism between water-soluble fullerenes and biological membranes (Spurlin and Gewirth 2007). The development of fundamental knowledge in that field is, thus, of great importance to evaluate the toxicity of these novel supramolecules for human cells and, eventually, to develop new antibiotic tools with increased efficiency and specificity (D’Rosario et al., 2009).

Our research is focused on the evaluation of the antibiotic potential of the water-soluble hydroxyfullerene derivative $C_{60}(OH)_{24}$ also known as fullerenol (FulOH). More specifically, we have studied the interaction of these NPs with model bacteria and eukaryote membranes using solid-state nuclear magnetic resonance (SS-NMR) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. These techniques allow the assessment of different aspects of molecular interactions with a membrane such as changes in the phospholipids’ dynamics and chemical environment around the polar headgroups and hydrophobic acyl chains.

The composition of natural membranes being too complex to allow direct NMR and FTIR analyses, model phospholipids membranes are generally employed (Warschawski et al., 2011). Because *Escherichia coli* inner and outer membranes contain about 20 mol% of negatively-charged phosphatidylglycerol (PG) on average (Seydel, 2002; Goldfine, 1984), vesicles composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) with 20 mol% of dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) were used in our study to mimic bacterial membranes (DPPC/DPPG). To verify any preferential affinity of the NPs to bacterial membranes, comparison was made with model eukaryote membranes. To do so, DPPC vesicles containing 20 mol% of cholesterol

(DPPC/Chol) were employed. PCs and cholesterol are natural phospholipids and sterol found in most mammalian cell membranes (Warschawski et al., 2011).

Solid-state NMR is a powerful technique that enables the study of exogenous particles in a membrane environment. By observing the appropriate nuclei, SS-NMR allows probing the effects of molecules on the membrane phospholipids. More specifically, ^{31}P SS-NMR spectra can reveal membrane perturbation at the surface of the polar headgroups (Seelig 1978), while ^2H SS-NMR using perdeuterated DPPC- d_{62} efficiently probes the effects on the hydrophobic region of the bilayer (Seelig, 1977; Killian et al., 1986; McConnell and Radhakrishnan, 2006). FTIR spectroscopy gives complementary information by studying the hydrophobic core of the bilayer via the CH_2 or CD_2 asymmetric stretching frequencies as previously reported by Mendelsohn and Mantsch (1986) and Mantsch and McElhaney (1991).

3.3 Materials and methods

3.3.1 Materials

Water-soluble fullereneol (99+%) was purchased in a powder form from M.E.R. Corporation (Tucson, AZ) as a mixture of nanoparticles with the general formula $\text{C}_{60}(\text{OH})_{16-18}(\text{ONa})_{6-8}$. Dipalmitoylphosphatidylcholine with perdeuterated acyl chains (DPPC- d_{62}), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoylphosphatidylglycerol sodium salt (DPPG) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Deuterium oxide was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA) while ^2H -depleted water and potassium chloride were acquired from Sigma Aldrich Inc. (St-Louis, MO). All chemicals were ACS grade or higher and were used as received without purification. Fullereneol and phospholipids were stored at -20°C .

3.3.2 Sample preparation

For the NMR experiments, multilamellar vesicles (MLVs) were prepared by mixing DPPC, DPPC- d_{62} and cholesterol in a molar ratio of 2:2:1 to mimic eukaryote-like membrane, while negatively-charged MLVs were prepared with DPPC, DPPC- d_{62} and DPPG in a molar ratio of 2:2:1 to model bacterial membranes. Non-labelled DPPC was used to minimize the expensive utilization of perdeuterated DPPC- d_{62} . All model membranes were prepared as follows: 20 mg of the phospholipids (or sterol) mixture was weighted and co-dissolved in chloroform (400 μ L), evaporated *in vacuo* for 24 hrs then lyophilized for three days before use. The dry material was then suspended in 100 μ L of a 50 mM KCl solution prepared in deuterium-depleted water, giving a total proportion of 20% w/v of phospholipids in water. The samples were submitted to three series of freeze (liquid N_2)/ thaw (52°C)/ vortex shaking cycles until a homogenous gel was obtained, and were stored at -20°C prior to analysis. The incorporation of the NPs into the MLVs was performed by rehydrating the phospholipids (\pm sterol) powder with the KCl solution containing 1.5 mg of dissolved FulOH. Then three cycles of freeze/thaw/vortex shaking was applied, leading to samples with a 5 mol% content of NPs and a neutral pH. About 50 to 55 mg of material were transferred into a 4-mm zirconium oxide rotor for NMR analysis. For FTIR study, the samples were prepared similarly, except that deuterium oxide was used instead of the 50 mM KCl solution and the membranes were prepared using perdeuterated DPPC- d_{62} only.

3.3.3 Solid-state NMR experiments

Spectra were recorded with a 600 MHz Varian Inova Unity spectrometer (Agilent, Santa Clara, CA) operating at frequencies of 246.86 MHz for ^{31}P and 92.12 MHz for ^2H using a 4-mm magic-angle spinning (MAS) probe. All spectra were collected in duplicate from 30°C to 50°C. A 600-s delay was allowed for temperature

equilibration between the experiments. Data were analysed using the MatNMR package (van Beek, 2007).

^{31}P static NMR spectra were recorded using a phase-cycled Hahn echo pulse sequence with broadband proton decoupling at a radiofrequency field of 50 kHz during the acquisition. 4000 scans were recorded with a spectral width of 50 kHz, a 90° pulse length of 4.5- μs , a 3-s recycle delay and 28- μs echo delays. Magic angle spinning was performed at a spinning frequency of 5 kHz and 512 scans were collected with a spectral width of 50 kHz, an acquisition time of 10 ms, a 3-s recycle delay and a 200- μs echo delay. Exponential line broadening functions of 25 and 10 Hz were applied for static and MAS spectra, respectively, and zero filling up to 16k was applied to MAS spectra only. Chemical shifts were referenced relative to H_3PO_4 85%. ^2H static NMR experiments were performed using a quadrupolar echo pulse sequence. 8000 scans were collected with a spectral width of 500 kHz, a 90° pulse length of 3- μs , an acquisition time of 10 ms, a 1-s recycle delay and a 45- μs echo spacing. Typically, a line broadening of 50 Hz was applied to the spectra.

3.3.4 FTIR experiments

Spectra were acquired on a Nicolet Nexus 670 spectrometer (Thermo-Nicolet, Madison, WI) equipped with a narrow-band mercury-cadmium-telluride (MCT) detector and a germanium-coated KBr beam splitter. Typically, 20 μL of freshly made sample were placed between CaF_2 windows separated by a 6- μm Mylar spacer. 50 scans were collected from 4000 to 400 cm^{-1} with a resolution of 2 cm^{-1} . Spectra were acquired at 1°C increments from 32 to 55°C . The spectrometer was continually purged with dry air. Spectra were corrected for water vapor and CaF_2 contributions by subtraction of a reference spectrum. Data were analysed using Grams/A1 version 7.02 (Galactic Industries Corporation, Waltham, MA).

3.4 Results

3.4.1 Interaction of fullerenol with model eukaryote membranes

Because phosphorus-31 nuclei have a 100% natural abundance and a high gyromagnetic ratio, ^{31}P NMR stands as a unique tool to study the motion and average orientation of the phosphate group in model phospholipid membranes. Since the electron cloud surrounding the phosphorus nucleus is not evenly distributed, the ^{31}P resonance frequency (and resulting chemical shift) depends on the phospholipids' orientation with respect to the magnetic field. The chemical shift anisotropy (CSA) - which reflects the spread of NMR frequencies with orientation - can be measured from the powder spectrum of non-oriented static samples. Dynamical information can be extracted from the CSA measurement as increased motion of the phospholipids will lead to its partial averaging. More specifically, the CSA ($\Delta\sigma$) can be expressed as, following the notation of Seelig (1978):

$$\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \quad (3.1)$$

where σ_{\parallel} and σ_{\perp} are the chemical shifts respectively obtained for parallel and perpendicular orientations with respect to the magnetic field (B_0) direction. The isotropic chemical shift can be introduced and these expressions rearranged to obtain:

$$\sigma_{\text{iso}} = 1/3 (\sigma_{\parallel} + 2\sigma_{\perp}) \quad (3.2)$$

$$\Delta\sigma = 3(\sigma_{\text{iso}} - \sigma_{\perp}) \quad (3.3)$$

The value of σ_{iso} can be determined from the ^{31}P NMR spectra acquired by magic-angle spinning (MAS) the sample at an angle of 54.7° with respect to B_0 , while σ_{\perp} is obtained by measuring the chemical shift of the 90° edge of the static ^{31}P NMR spectra at 90% of the maximum intensity (Picard et al., 1999). We have thus used ^{31}P SS-NMR spectroscopy to investigate the effects of 5 mol% fullerenol on model DPPC/Chol membranes. The static spectra are presented in Fig. 3.1 while the spectra acquired at an MAS frequency of 5 kHz are shown in Fig. 3.2. As can be observed in Fig. 3.1, the static spectra are typical of a lipid mixture organized into

MLVs, with axial symmetry of DPPC's ^{31}P chemical shift tensor as described by Seelig (1978). In the presence of 5 mol% FulOH, a minor effect is observed on the spectra (Fig.3.1) below and above DPPC's gel-to-liquid crystal phase transition (melting) temperature ($T_m=41^\circ\text{C}$) (Vist and Davis, 1990; Guo and Hamilton, 1995). The CSA values calculated from Fig. 3.1 and 3.2 are reported in Table 3.1 and show less than 1% of variation at 35°C only. Together, those observations suggest minimal interaction of FulOH with DPPC's headgroups. Additional information on the interaction of fullerenol with the phospholipid headgroups in DPPC/Chol membranes can be obtained from the ^{31}P NMR MAS spectra displayed in Fig. 3.2. The isotropic chemical shift is characteristic of each phospholipid but most importantly, depends on the phosphorus nucleus electronic environment. It is thus possible to verify shielding/deshielding effects of the NPs on the lipid phosphate region by monitoring changes in σ_{iso} value. In addition, changes in headgroup dynamics can lead to changes in the full width at half height of the isotropic resonances obtained by MAS. Similarly to the static spectra, Fig. 3.2 shows that the MAS spectra of DPPC/Chol system without and with 5 mol% FulOH are almost identical, with a σ_{iso} value difference of less than 0.01 ppm observed only at 40°C (Table 3.1).

Table 3.1: ^{31}P chemical shift anisotropy ($\Delta\sigma \pm 0.2$ ppm) of DPPC in DPPC/Chol membranes calculated from static and MAS spectra

Temperature ($^\circ\text{C}$)	FulOH (mol%)	σ_{iso} (ppm)	σ_{\perp} (ppm)	$\Delta\sigma$ (ppm)
35	0	-0.91	-16.5	46.8
35	5	-0.91	-16.4	46.5
40	0	-0.90	-16.4	46.5
40	5	-0.89	-16.4	46.5
45	0	-0.87	-16.3	46.3
45	5	-0.87	-16.3	46.3

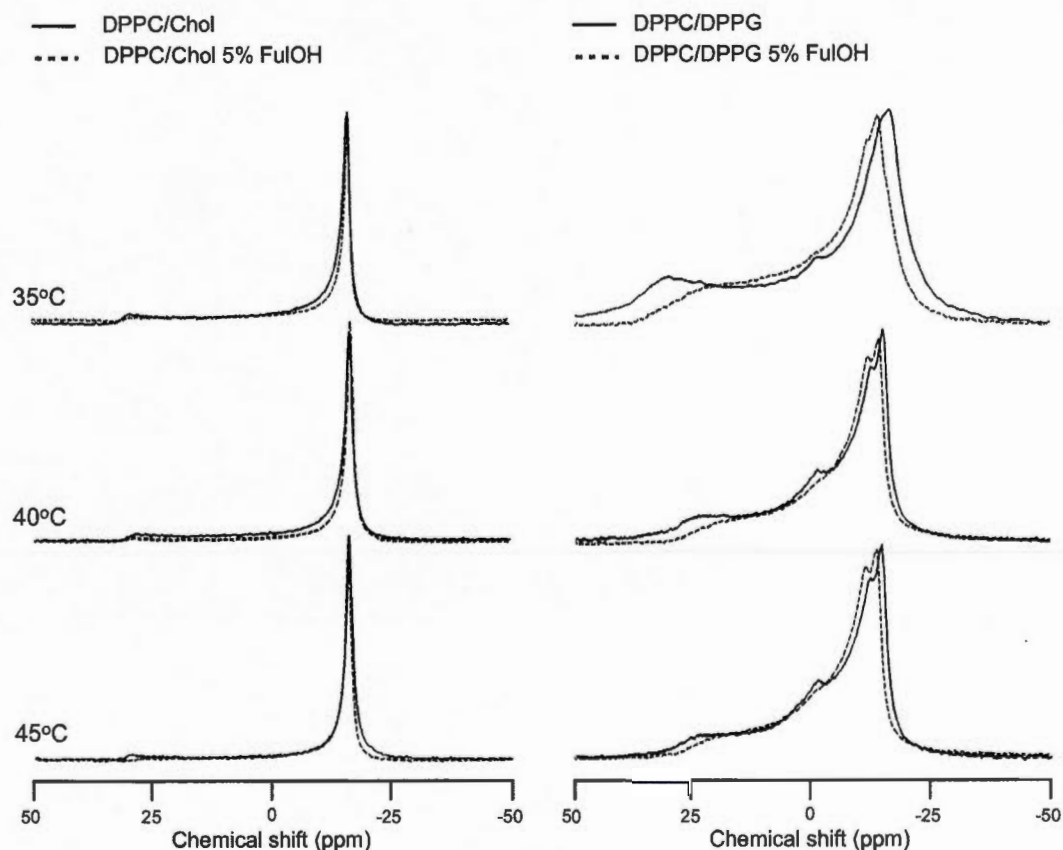


Figure 3.1: Temperature dependence of the static ^{31}P NMR spectra of DPPC/Chol (left column) and DPPC/DPPG membranes (right column) at a molar ratio of 4:1, without and with 5 mol% FulOH.

To investigate the interaction of FulOH with the hydrophobic region of DPPC/Chol bilayers, phosphatidylcholines with deuterated acyl chains (DPPC- d_{62}) were used and the ^2H NMR spectra recorded. The degree of organization along these chains is reflected by changes of the quadrupolar splitting ($\Delta\nu_Q$) value of a given C-D bond. The quadrupolar splitting for a C-D bond in a lipid bilayer with axial symmetry is given by:

$$\Delta\nu_Q = (3/4h)e^2qQ(3\cos^2\theta - 1) \cdot S_{\text{CD}} \quad (3.4)$$

where (e^2qQ/h) is the quadrupole coupling constant (~ 167 kHz), θ is the angle between the bilayer normal and the lipid long axis, and S_{CD} is the order parameter of a deuterium bond vector (Davis, 1983; Seelig and Seelig, 1980). An increase in the quadrupolar splitting is indicative of an ordering effect of the NPs on the lipid acyl chains, while a decrease reflects a disordering effect (Davis, 1983). Fig. 3.3 shows that with 5 mol% FulOH content, the spectra are rigorously identical to the control membranes. The line shapes are characteristic of phospholipids assembled in an ellipsoidal vesicles in a so-called "unique liquid ordered" phase below and above DPPC's T_m . At 35°C, the spectra are broad and the edges corresponding to the plateau region of the chains (close to the lipid headgroup) are partially flattened, suggesting a slight gel phase contribution to DPPC- d_{62} /Chol spectra at 35°C (Endress et al., 2002; McConnell and Radhakrishnan, 2006).

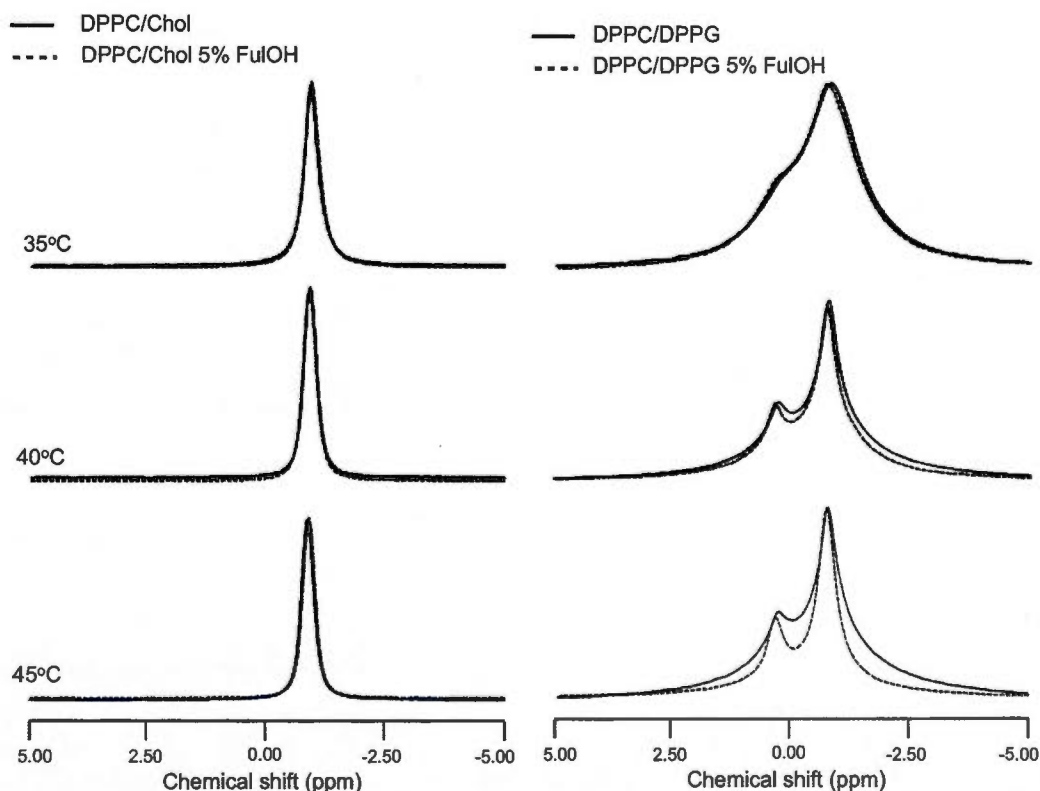


Figure 3.2: Temperature dependence of the ^{31}P MAS NMR spectra of DPPC/Chol (left column) and DPPC/DPPG membranes (right column) at a molar ratio of 4:1, without and with 5 mol% FulOH obtained at an MAS frequency of 5 kHz.

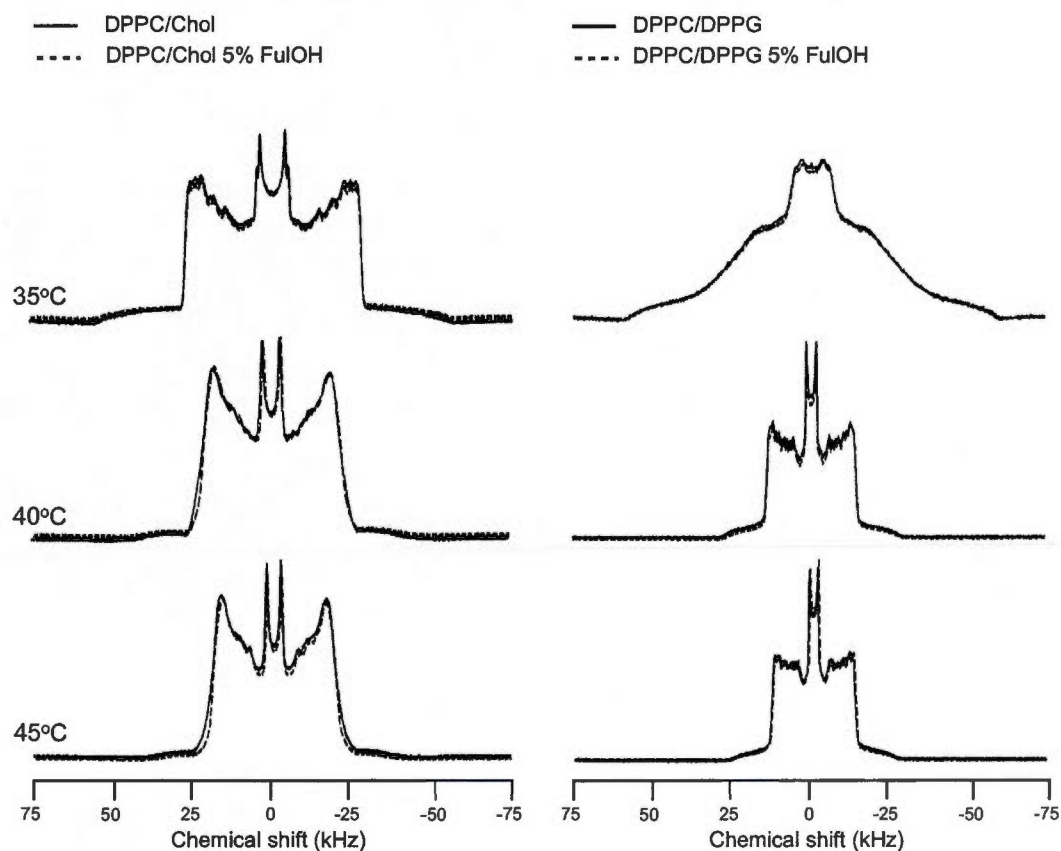


Figure 3.3: Temperature dependence of the ^2H NMR spectra of DPPC- d_{62} /Chol (left column) and DPPC- d_{62} /DPPG membranes (right column) at a molar ratio of 4:1, without and with 5 mol% FulOH.

To further assess the effect of FulOH on the hydrophobic region of the model eukaryote membranes, the thermotropic behaviour of DPPC in the DPPC/Chol mixture has been studied. It can be obtained by plotting the value (in cm^{-1}) of the methylene symmetric or asymmetric ($\nu_{\text{asym}}\text{CH}_2$) stretching frequencies in the lipid acyl chains as a function of temperature (Mendelsohn and Mantsch, 1986). These stretching vibrations are sensitive to changes in the trans/gauche conformer ratio and inform on structural rearrangements in lipid bilayers such as the gel-to-liquid crystal phase transition (Casal and Mantsch, 1984; Mendelsohn and Mantsch, 1986). The study of the asymmetric stretching frequency displayed in Fig. 3.4A shows that cholesterol slightly attenuates the clear phase transition normally observed for pure

DPPC, with a broader melting zone observed between 39 and 42°C (Mannock et al., 2010). The presence of 5 mol% FulOH in the model membranes does not affect the transition temperature of the bilayer. With and without fullereneol, T_m approximatively corresponds to the theoretical value of 41°C for pure DPPC (Vist and Davis, 1990; Guo and Hamilton, 1995). A slight increase in the vibration frequency of $\sim 0.5\text{ cm}^{-1}$ is observed above T_m in the presence of 5 mol% FulOH and can be ascribed to a minor increase of motion in the lipid chains (Mendelsohn and Mantsch, 1986; Mantsch and McElhaney, 1991).

3.4.2 Interaction of fullereneol with model bacterial membranes

SS-NMR and FTIR spectroscopy were also exploited to probe the effect of fullereneol on model bacterial membranes. First, the interaction of the NPs with the phospholipid headgroups in DPPC/DPPG bilayers was studied by ^{31}P static NMR as shown in Fig. 3.1. DPPC and DPPG are perfectly miscible phospholipids (Vincent et al., 1993). All spectra without and with 5 mol% FulOH are typical of a lamellar phase with axial symmetry (Seelig, 1978). However, at 35°C, i.e. below the phase transition temperature of the pure lipids ($T_m \sim 40\text{--}41^\circ\text{C}$) (Killian et al., 1986; Vist and Davis, 1990; Guo and Hamilton, 1995), the DPPC/DPPG spectrum is broader due to residual dipolar couplings, typical for lipids in the gel phase (Killian et al., 1986). The gel phase is not observed in the presence of the NPs. The presence of 5% FulOH would thus lower the gel-to-fluid transition temperature.

A closer analysis of the ^{31}P static SS-NMR spectra in Fig.3.1 reveals two distinct spectral components. As reported by Seelig and Seelig (1980), PC and PG have similar headgroup structures and motions, and the larger CSA is attributed to DPPC (Table 3.1) (Marcotte et al., 2004). A small isotropic component is visible in all spectra, including the control membrane. Bensikaddour and al. (2008) reported a similar isotropic component for pure DPPG and assigned it to the presence of smaller vesicles. In the presence of fullereneol, the spectra show a change in the orientation distribution between the 0° and 90° edges, with an increase in the 90°

edge intensity for all temperatures studied. This can be ascribed to a greater contribution of membrane phospholipids oriented at 90° with respect to B_0 (Marcotte et al., 2004). This effect is accentuated with the temperature. The spectral widths are also narrowed, and calculation of the CSA (Table 3.2) shows an average decrease of $\sim 13\%$ for DPPG and 10% for DPPC at 40 and 45°C .

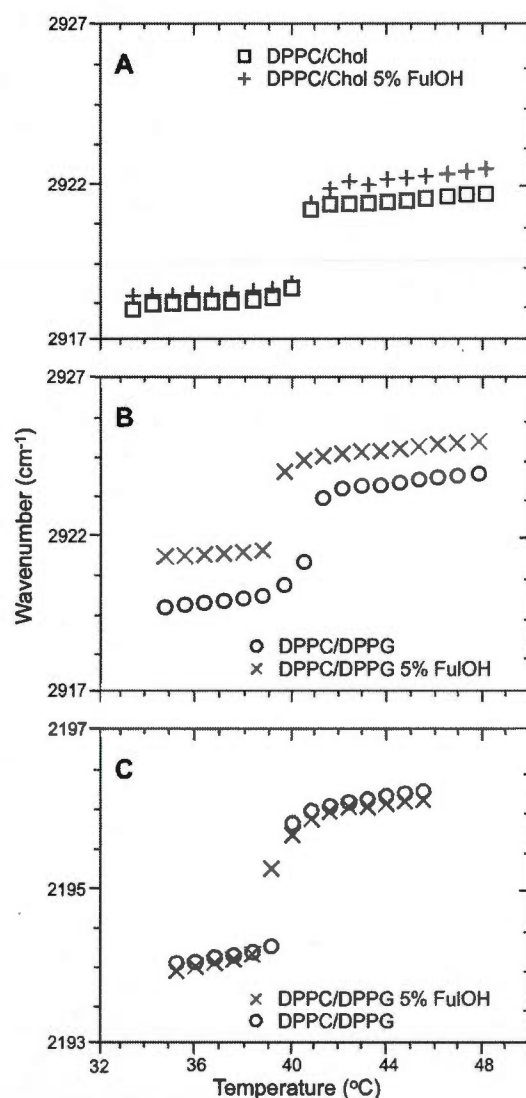


Figure 3.4: Temperature dependence of the frequency of the CH_2 asymmetric stretching vibration of (A) DPPC in DPPC/Chol; (B) DPPG in DPPC/DPPG and (C) the CD_2 asymmetric stretching vibration of DPPC- d_{62} in DPPC- d_{62} /DPPG membranes at a molar ratio of 4:1, without and with 5 mol% FulOH.

This result could be attributed to increased motions of the lipid head group or the whole lipid (Smith and Ekiel, 1984). Noteworthy, the CSA variation in the presence of 5 mol% FulOH is more important at 35°C, i.e. below the mixture's melting temperature: a decrease of 16% and 13% is observed for DPPG and DPPC respectively. The presence of two spectral components is also visible in the ^{31}P NMR MAS spectra at a spinning frequency of 5 kHz (Fig.3.2). The relative area of those isotropic signals is approximatively 4:1 which corresponds to the phospholipids' molar ratios used in the preparation of the model membranes, with DPPC as the major constituent.

No significant effect can be observed on the isotropic chemical shift of both phospholipids in the presence of 5 mol% FulOH at 35°C. However, an important averaged downfield shift of 0.11 ppm is observed for DPPG at 40 and 45°C. Also, narrowing of DPPC and DPPG's isotropic resonances is seen in the MAS spectra and a better separation between the two spectral components of the phospholipids is observed (Fig.3.2). This effect is more important in the presence of the NPs at 45°C, i.e. above the mixture's T_m .

Table 3.2: ^{31}P chemical shift anisotropy ($\Delta\sigma \pm 0.2$ ppm) of DPPC and DPPG in DPPC/DPPG membranes calculated from static and MAS spectra

Temperature (°C)	FulOH (mol%)	DPPG			DPPC		
		σ_{iso} (ppm)	σ_{\perp} (ppm)	$\Delta\sigma$ (ppm)	σ_{iso} (ppm)	σ_{\perp} (ppm)	$\Delta\sigma$ (ppm)
35	0	0.25	-14.3	43.7	-0.79	-16.3	46.5
35	5	0.29	-11.9	36.6	-0.74	-14.1	40.1
40	0	0.27	-12.3	37.7	-0.78	-14.8	42.1
40	5	0.37	-10.8	33.5	-0.71	-13.4	35.1
45	0	0.27	-12.3	37.7	-0.78	-14.8	42.1
45	5	0.39	-10.5	32.1	-0.72	-13.2	34.4

Interestingly, the linewidth of DPPG decreases by 40% whereas the one of DPPC only decreases by 30%. A greater perturbation of the PG headgroup by FulOH is thus observed. To probe the insertion of FulOH into the bilayer, the effect of the NPs on DPPC- d_{62} acyl chains in the DPPC/DPPG model membranes was studied by ^2H SS-NMR. As shown in Fig. 3.3, the spectra obtained without and with 5 mol% FulOH show minimum perturbation of the phosphatidylcholine acyl chains in the DPPC- d_{62} /DPPG mixture. Interestingly at 35°C, i.e. below the lipid phase transition temperature, the spectra are superimposable and show a broad distribution associated with lipids in the gel phase. As observed by ^{31}P SS-NMR, spectra acquired above 35°C are typical of fluid phase lineshapes and quasi identical with and without NPs.

In order to verify a preferential interaction of fulleranol NPs with DPPG, we have studied by FTIR spectroscopy the CH_2 and CD_2 asymmetric stretching vibration frequencies of DPPG and DPPC- d_{62} , respectively, as a function of temperature in DPPC- d_{62} /DPPG model membranes. It is known that the mass variation due to isotopic substitution changes the frequency of the absorption band without affecting the force constants (Mendelsohn and Mantsch, 1986). It is therefore possible to study the effect of FulOH on the two phospholipids in a single thermotropic analysis using one lipid with perdeuterated acyl chains and one protonated lipid. Such a study, thus, complements the information obtained on the hydrophobic core of the membranes by ^2H NMR. As shown in Fig. 3.4C, DPPC- d_{62} acyl chains are not perturbed by the presence of 5 mol% FulOH. As well, the gel-to-liquid crystal phase transition temperature is unchanged, i.e. $\sim 39^\circ\text{C}$, which is close to the value of 38°C reported for DPPC- d_{62} (Kilfoil and Morrow, 1998). Only a slight broadening of the melting zone is visible in the presence of fulleranol, indicating a less cooperative melting process that could be ascribed to phase separation (Mendelsohn and Mantsch, 1986; Mantsch and McElhaney, 1991; Mannock et al., 2010). Indeed, analysis of $\nu_{\text{asym}}\text{CH}_2$ associated to DPPG's acyl chains in Fig. 3.4B reveals that DPPG's melting temperature is in the expected range of 40 to 41°C (Killian et al., 1986) in the pure model membranes. However, a 2°C decrease of DPPG's T_m as well as an increase ($\sim 1\text{ cm}^{-1}$) in the vibration frequencies for all temperatures studied

(Fig.3.4B) are observed in the presence of 5 mol% FulOH. These results indicate a decreased ordering of the chains due to a greater number of gauche conformers in DPPG's acyl chains. They also reveal a selective affinity of the NPs for the anionic DPPG in DPPC/DPPG membranes.

3.5 Discussion

Interaction of fulleranol with eukaryote model membranes

Fullerenol is a hydrosoluble spherical amphiphilic molecule containing a "waxy" carbon cage surrounded by 24 polar hydroxyl units (Mateo-Alonso et al., 2006). The NMR and FTIR investigations of the interaction between FulOH and DPPC/Chol bilayers seem to indicate no affinity of these NPs for eukaryote membranes. Indeed, the results obtained by ^{31}P static and MAS SS-NMR spectroscopy show insignificant effects of FulOH on DPPC phosphate group. The study of DPPC acyl chains reveals a small decrease in the quadrupolar splitting of ~ 1 kHz on the ^2H NMR spectra as well as a slight augmentation of the CH_2 asymmetric stretching vibration frequency in FTIR, but these changes fall within the experimental error of the measurements.

Our results are in agreement with molecular dynamics simulations carried out by D'Rozario and co-workers (2009) on $\text{C}_{60}(\text{OH})_{20}$ in DPPC bilayers which suggest that the polar NPs would preferentially remain at the bilayer/water interface. Nevertheless, FulOH is a polar NP which has the ability to create H-bonds with water and cholesterol. A potential interaction with cholesterol which would only be observable at higher concentrations is therefore possible.

Interaction of fulleranol with model bacterial membrane

Contrary to eukaryote-like membranes, the results obtained by SS-NMR and FTIR spectroscopy confirm a clear interaction of the $C_{60}(OH)_{24}$ NPs with model bacterial membranes. Indeed, FulOH increases the phospholipids' mobility in the bilayer, as revealed by the decrease in the CSA measured from the ^{31}P SS-NMR spectra, especially in the gel phase (Table 3.2). Concomitantly, the narrowing of the isotropic peak width for both lipids (Fig.3.2) indicates a longer transverse relaxation time (T_2) due to increased lipid motion. Moreover, an increase in the proportion of phospholipids oriented at 90° with respect to the magnetic field is also observed on the ^{31}P static SS-NMR spectra when FulOH is added (Fig.3.1). This suggests the formation of more elongated DPPC/DPPG vesicles as was observed for met-enkephalin in DMPG vesicles (Marcotte et al., 2004). This could be explained by greater bilayer fluidity.

Although perturbing all lipids' organization and motion in the bilayer, FulOH preferentially interacts with DPPG molecules in the bilayer. 2H SS-NMR results show that the NPs have no effect on the deuterated acyl chains of DPPC- d_{62} in DPPC- d_{62} /DPPG bilayers at the concentration studied (Fig.3.3). This is confirmed by FTIR spectroscopy where no significant changes are seen on the CD_2 asymmetric stretching vibration frequencies of DPPC- d_{62} in the temperature range examined (Fig.3.4C). However, the thermotropic behavior of DPPG's $\nu_{asym}CH_2$ (Fig.3.4B) clearly reveals a $2^\circ C$ decrease of the phase transition temperature as well as an important increase in the vibration frequency at all temperatures in the presence of 5 mol% FulOH, indicative of a disordering of DPPG acyl chains both the gel and liquid crystalline phases. These results also indicate a lipid segregation in the bilayer due to the preferential interaction of $C_{60}(OH)_{24}$ NPs with the anionic phospholipids.

Considering the lack of interaction of FulOH with DPPC molecules and the propensity of fulleranol to remain at the bilayer/water interface, the presence of lipid polar groups such as the glycerol hydroxyl moiety at the membrane surface seems to play a key role in the interaction of FulOH NPs with a membrane. The OH groups

surrounding the fullerene center of the NPs would most likely selectively interact with DPPGs' phosphatidylglycerol groups. This would force the phospholipids to form DPPG- and DPPC-rich domains in the bilayer. The hydroxyl group in PGs' polar head is thought to be involved in strong H-bonding to the phosphate moiety of neighbouring molecules (Zhang et al., 1997). An interaction of the NPs with the OH groups would disturb the molecular packing of the phospholipids and allow greater motion of the acyl chains, in addition to more fluidity of the overall bilayer. H-bonding of FulOH with DPPG's phosphate group seems improbable since the ^{31}P CSA of DPPG is decreased in the presence of the NPs, and no significant variation in the isotropic chemical shift is observed (Epand and Vogel, 1999).

3.6 Conclusion

The results obtained by FTIR, ^{31}P and ^2H SS-NMR spectroscopy reveal low affinity of fullerenol for DPPC in DPPC/Chol membranes. The NPs would remain at the bilayer/water interface, although H-bonds with cholesterol cannot be ruled out. Interestingly, a selective interaction was identified with negatively-charged PGs in DPPC/DPPG membranes, thus causing lipid segregation in the bilayer. Our results indicate that FulOH would remain in the polar region of the bilayer due to H-bonding with the phosphatidylglycerol hydroxyl group. As a result, the DPPG packing would be perturbed as well as the bilayer fluidity. The selective interaction of fullerenol with PG and perturbing effect on bacterial model membranes is of great interest since PG is not found in eukaryote membranes. Our study demonstrates that new fullerenol-based antibiotics could be designed to target bacterial membranes similarly to the action mechanism of antimicrobial peptides.

3.7 Acknowledgments

This work was supported by the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF), as well as the Canadian Foundation for Innovation (CFI). P.P.B. is grateful to the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Strategic Training Initiative in Chemical Biology for the award of an MSc scholarship. The authors wish to thank P. Bazire and C. Bourgeois for technical assistance.

CHAPITRE IV

SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES

4.1 Introduction

4.1.1 La synthèse du C_{60}

Le buckminsterfullerène (C_{60}) a été synthétisé en laboratoire pour la première fois en 1985, à l'aide de l'irradiation du graphite par le laser sous vide, dans des conditions expérimentales imitant les conditions interstellaires (Kroto et al., 1985). Le C_{60} a une masse exacte de 720,00 g/mol et sa structure a été déterminée par la spectroscopie de masse de haute résolution.

Plusieurs variations de cette technique de vaporisation du graphite sont aujourd'hui utilisées par l'industrie, comme par exemple le jet-d'arc (Alekseyev et Dyuzhev, 2003), le plasma (Dubrovsky et al., 2004) et le filament résistif à haute température (Scott, 2004). Aussi, la technique de combustion à la flamme d'un mélange d'hydrocarbures est très efficace pour la fabrication industrielle et permet de fabriquer le fullerène à l'échelle du kilogramme à un coût avoisinant les 200 \$/kg (Scott, 2004). Lorsque le graphite est transformé dans ces conditions, un mélange complexe de dérivés du charbon est obtenu et ce mélange comporte seulement environ 1% de fullerènes mixtes (C_{60} à C_{100}).

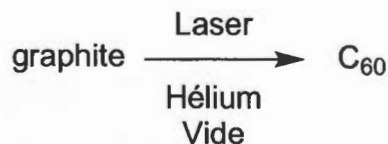


Figure 4.1: Approche synthétique pour la première synthèse du fullerène.

Les principaux fullerènes obtenus sont le C_{60} et le C_{70} (Scott, 2004). Ensuite, le réel défi survient: la séparation et la purification. Les molécules de fullerènes sont extraites sélectivement du mélange généralement à l'aide de toluène et les molécules de C_{60} sont séparées à l'aide de la chromatographie liquide préparative (HPLC) et purifiées par sublimation. Dans le but d'obtenir du C_{60} de haute pureté, il est impératif de réaliser ces étapes de purification plusieurs fois. Les techniques de séparation et de purification sont simples et faciles, de plus la toxicité du fullerène est plutôt faible. Par conséquent, plusieurs laboratoires d'enseignement dans les universités et collèges ont adopté ces manipulations pour les cours de chimie sous-gradués (Spencer et al., 2006).

De cette manière, le fullerène peut être isolé aisément à l'échelle de quelques grammes avec une pureté supérieure à 99% (Komatsu et al., 2004). En 2002, la première synthèse rationnelle multi-étapes du fullerène a été publiée dans la revue *Science* (Scott et al., 2002). À l'aide de la chimie organique, le C_{60} fut synthétisé en douze étapes à partir du 4-bromochlorobenzène avec un rendement total de 0,1 à 1%. L'étape clé de cette synthèse est la cyclisation finale et consiste à replier une large molécule plane polycyclique de type arène sur elle-même et de créer les nouvelles liaisons chimiques à l'aide d'une pyrolyse *flash vacuum* à très haute température (1100°C). Les rendements de cette étape clé sont faibles et de façon générale, l'approche synthétique n'offre aucun avantage sur les méthodes conventionnelles de fabrication du fullerène à la flamme. La synthèse rationnelle des fullerènes demeure un défi important pour les chimistes organiciens.

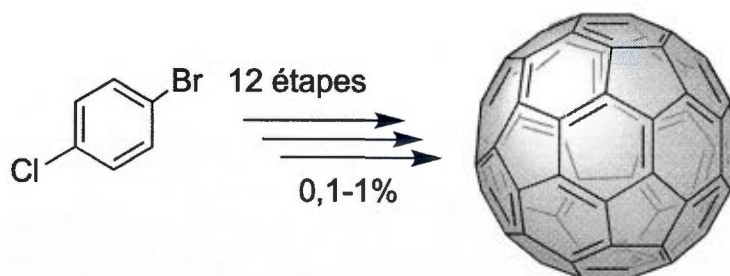


Figure 4.2: Approche synthétique pour la première synthèse multi-étapes du fullerène.

4.1.2 Réactivité du C_{60}

La LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) du C_{60} est de basse énergie et est au niveau de dégénérescence triplet. Par conséquent, le fullerène accepte de façon réversible jusqu'à six électrons en solution. Le fullerène est un accepteur d'électrons de type multi-anions. Il se démarque par la très grande symétrie de son système π et de sa structure de type bipyramidale comportant des cycles à cinq et à six (Nazario et al., 1998).

La réactivité chimique du fullerène est celle d'un polyalcène tendu cycliquement, déficient en électron ayant 30 doubles liaisons plutôt *localisées* sur la sphère. La densité électronique des jonctions de cycles 6,6 est plus importante que pour les jonctions de cycles 6,5 (Fig.4.3). Par conséquent, les réactions chimiques d'addition et de cycloaddition démontrent une régiosélectivité pour les jonctions de cycles 6,6, favorisant le produit thermodynamiquement plus stable (Mateo-Alonso et al., 2006; Diederich, 1997).

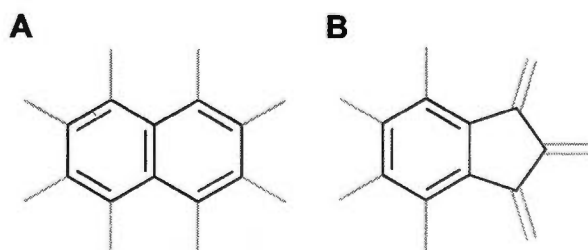


Figure 4.3: Représentation d'une jonction de cycle (A) 6,6 et (B) 6,5 du fullerène.

4.1.3 Réactions d'addition

De façon générale, le fullerène est très susceptible aux réactions d'addition. Il réagit avec les halogènes (F_2 , Cl_2 , Br_2) (Olah et al., 1991; Tebbe et al., 1992; Denisenko et al., 2004) pour former des composés de haute symétrie du type $C_{60}X$, ($X = 6, 12, 18, 24, 36, 48$). Le fullerène est susceptible aux additions multiples de nucléophiles et réagit par conséquent avec les organocuprates (Matsuo et Nakamura, 2008), les organolithiens et les réactifs de Grignard (Nagashima et al., 1994). Il est possible de contrôler le nombre d'additions en faisant varier les conditions expérimentales (solvant et température), la nature et la stoechiométrie des réactifs utilisés.

En présence de métaux de transition, le fullerène réagit avec une molécule d'eau (Tuktarov et al., 2008) et l'hydrogène moléculaire (Tarasov et al., 1997). Aussi, le fullerène est réduit dans les conditions de Birch et d'hydroboration (Govindaraj, 1993). De cette façon, il est possible de former des hydrures de fullerène ayant la structure générale $C_{60}H_{1-48}$. La présence d'un nombre élevé d'atomes d'hydrogène crée de la tension dans le cycle du fullerène. Par conséquent la stabilité de ces composés est diminuée, le fullerène se dégrade et des hydrocarbures aromatiques de type polycycliques sont produits (Tarasov et al., 1997). Expérimentalement, le nombre maximal d'hydrogène additionné est de 48. Ces molécules sont utilisées dans le domaine de la recherche des piles de stockage à hydrogène (Louffy et Mexler, 2001).

4.1.4 Bromination du C_{60}

Le C_{60} réagit avec le brome moléculaire à température ambiante dans une réaction d'addition 1,4 aux jonctions de cycles 6,6 pour former un composé de très haute symétrie, le $C_{60}Br_{24}$ (Fig.4.4) (Tebbe et al., 1992). La cinétique de la réaction est accélérée par l'utilisation d'une quantité catalytique de $FeBr_3$. En présence de l'acide de Lewis, la réaction est très rapide et s'effectue en moins de 40 minutes (Djordjevic et al., 1998). Les études de cristallographie par rayons-X ont démontré que ce produit est isolé sous la forme solvatée $C_{60}Br_{24}(Br_2)_{0,5-2}$. Environ 25 à 28 atomes de brome sont présents autour du fullerène. Par conséquent d'un à trois atomes de brome sont "libres" et sont liés de façon non-covalente dans la sphère de coordination du fullerène. Les liens C-Br sont de type sp^3 , déforment la surface sphérique du fullerène et modifient ainsi les conformations des cycles à cinq et à six. Les 24 atomes de brome liés de façon covalente enveloppent la surface du fullerène et blindent les 18 doubles liaisons restantes contre toute addition supplémentaire. Dans cette configuration, tous les atomes de brome sont en position relative 1,3 et aucun atome de brome ne se retrouve sur deux carbones adjacents. La réaction est réversible et les produits de départ, le C_{60} et le Br_2 sont récupérés de façon quantitative lorsque le bromofullerène est chauffé à des températures supérieures à $150^\circ C$ (Tebbe et al., 1992). Le bromofullerène ($C_{60}Br_{24}$) est disponible commercialement et peut être synthétisé facilement en laboratoire dans un rendement presque quantitatif.

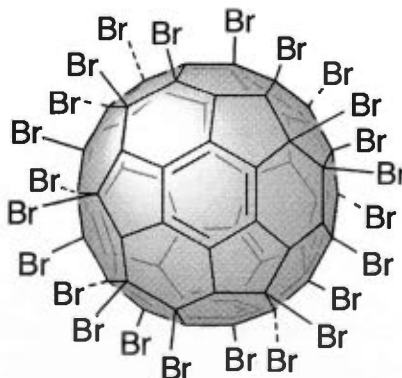


Figure 4.4: Structure simplifiée du bromofullerène $C_{60}Br_{24}$.

4.1.5 Hydroxylation du C_{60}

Le fullerénol $C_{60}(OH)_{24}$ de haute symétrie (Fig.4.5) est obtenu directement à partir du bromofullerène ($C_{60}Br_{24}$) en le faisant réagir dans un excès d'hydroxyde de sodium dans un milieu éthanol-eau à température ambiante (Bogdanovic et al., 2004). Il existe des méthodes synthétiques qui permettent d'introduire directement des unités hydroxylées en très grand nombre (12 à 44) à partir du C_{60} . Parmi elles, on retrouve la sulfatation suivie d'une hydrolyse (douze unités) ou d'une peroxydation (36 unités) (Kokubo et al., 2008).

L'hydroxylation directe du C_{60} catalysée par un agent de transfert de phase à l'aide d'un excès d'hydroxyde de sodium ou de peroxyde d'hydrogène produit en une étape un fullerénol contenant de 24-26 et 44 unités hydroxylées respectivement (Li et al., 1993; Kokubo et al., 2011). Ces méthodes ne sont pas régiosélectives et par conséquent plusieurs isomères structuraux sont obtenus. Les fullerénols purs sont difficiles à obtenir et des impuretés provenant d'oxydation ou de réarrangements - du type Pinnacol et de l'équilibre céto-énol entre deux fonctions hydroxy vicinales - sont observées (Gayathri et al., 2003; Xing et al., 2004).

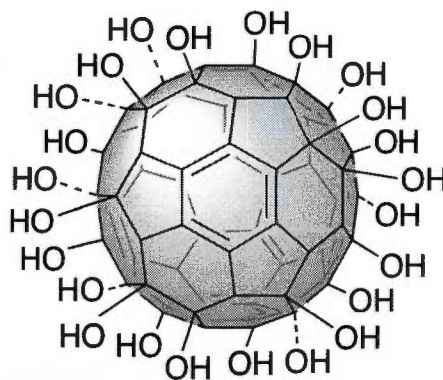


Figure 4.5: Structure simplifiée du $C_{60}(OH)_{24}$.

4.1.6 Réactions de cycloaddition

Le C_{60} est un électrophile et la réactivité de son système π lui permet de former des produits de cycloaddition de type [2+2], [3+2] et de [4+2]. Durant la réaction de type électrophile, les liens $C=C$ se brisent et le caractère trigonal sp^2 du fullerène diminue. Le changement de conformation durant la réaction favorise la formation des liens $C-C$ à caractère tétraédrique de type sp^3 . Par conséquent, la tension de cycle dans le fullerène diminue et cette diminution de tension représente le "*driving force*" de la réaction (Mateo-Alonso et al., 2006; Diederich, 1997).

4.1.7 La cycloaddition 1,3-dipolaire

La réaction de Prato (Fig.4.6) est une méthode très versatile pour fonctionnaliser le fullerène (Prato et Maggini, 1998; Kordatos et al., 2001). C'est une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un ylure d'azométhine et le C_{60} (Maggini et al., 1993) et le produit obtenu est un fulléropyrrolidine. L'ylure est généré *in situ* par la décarboxylation thermique de l'intermédiaire généré lors de la condensation entre la glycine et un excès d'aldéhyde utilisé dans la réaction. La réaction de Prato permet d'introduire des substituants de façon stratégique en faisant varier la N-substitution sur la glycine et le groupement fonctionnel sur l'aldéhyde. Il est possible de contrôler la stoechiométrie de la réaction pour obtenir uniquement le produit de mono-addition, de bis ou de tris-addition majoritairement (Maggini et al., 1993; Kordatos et al., 2001; Marchesan et al., 2005).

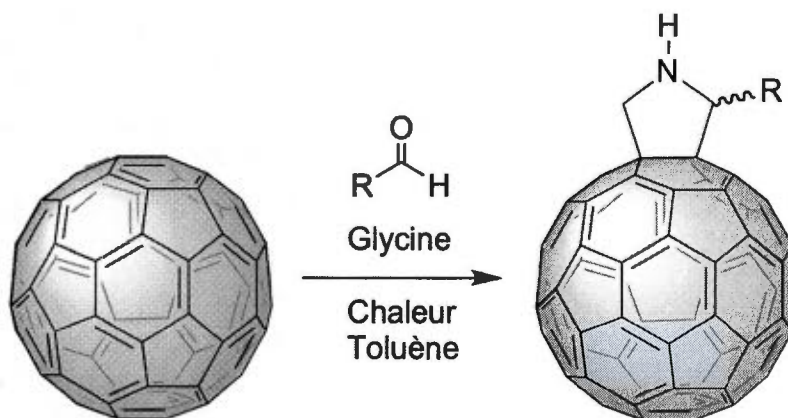


Figure 4.6: Schéma réactionnel de la réaction de Prato.

La cycloaddition thermique [3+2] entre un azoture et le C_{60} est aussi une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire permettant d'introduire des groupements fonctionnels via la formation d'un azafullerène. La décomposition thermique de l'azoture s'effectue aux températures supérieures à $80^{\circ}C$ et l'addition du nitrène généré est régiosélective aux jonctions de cycles 6,6 du fullerène (Fig.4.7) (Mateo-Alonso et al., 2006; Diederich, 1997).

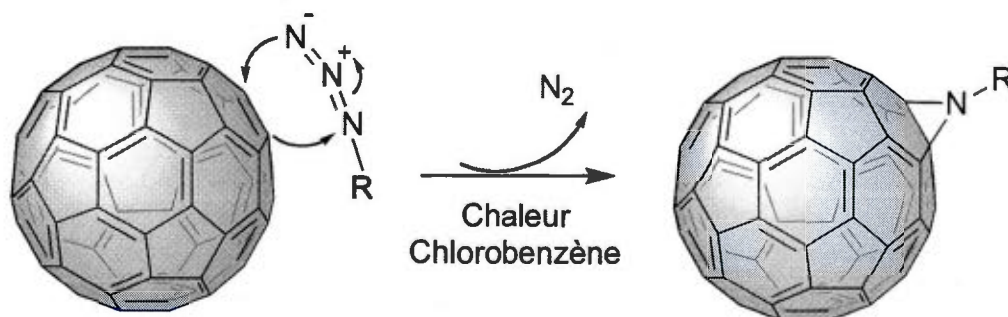


Figure 4.7: Schéma réactionnel de la synthèse d'un azafullerène.

4.1.8 Les réactions de cyclopropanation

La cyclopropanation est une réaction très utile pour introduire des substituants sur le fullerène et s'effectue *via* l'addition de carbène, l'addition des composés diazos suivi d'une thermolyse ou par la réaction de cyclopropanation de Bingel (Mateo-Alonso et al., 2006; Diederich, 1997). La méthode de cyclopropanation de Bingel (Bingel, 1993) est la méthode la plus douce et efficace qui permet d'introduire des substituants *via* la formation d'un lien de type cyclopropane sur le C₆₀. C'est une réaction d'addition-élimination entre le fullerène et un nucléophile de type carbanion généré *in situ* à l'aide d'une base sur un dérivé de l'acide bromomalonique. La synthèse du bromomalonate est souvent compliquée et des mélanges inséparables de bromo- et de dibromo- malonates sont obtenus, ce qui limitent grandement cette approche à des molécules simples (Chabre et Roy, 2010).

Le méthanofullerène produit par cette réaction possède deux unités carboxyliques facilement fonctionnalisables par la suite. Il est possible de contrôler la stoechiométrie des réactifs et d'introduire jusqu'à six unités malonates en une seule étape sur le C₆₀ (Hirsch et al., 1994; Chabre et Roy, 2010; Nierengarten et al., 2010). Aussi, la modification Bingel-Hirsch (Camp et Hirsch, 1997) utilisant la base forte 1,8-Diazabiscycloundéc-7-ène (DBU) et le CBr₄ (ou I₂) afin de générer *in situ* l'intermédiaire bromé (ou iodé) du malonate permet de diminuer le nombre d'étapes synthétiques et permet de greffer des fulléroglycodendrons plus complexes directement sur le fullerène (Fig.4.8) (Chabre et Roy, 2010; Nierengarten et al., 2010). Cette stratégie est très utilisée pour synthétiser les "sugar balls", des dérivés hydrosolubles du fullerène possédant plusieurs sucres greffés en périphérie (Kato et al., 2007; Chabre et Roy, 2010; Nierengarten et al., 2010). Cette application spécifique sera plus approfondie dans la prochaine section.

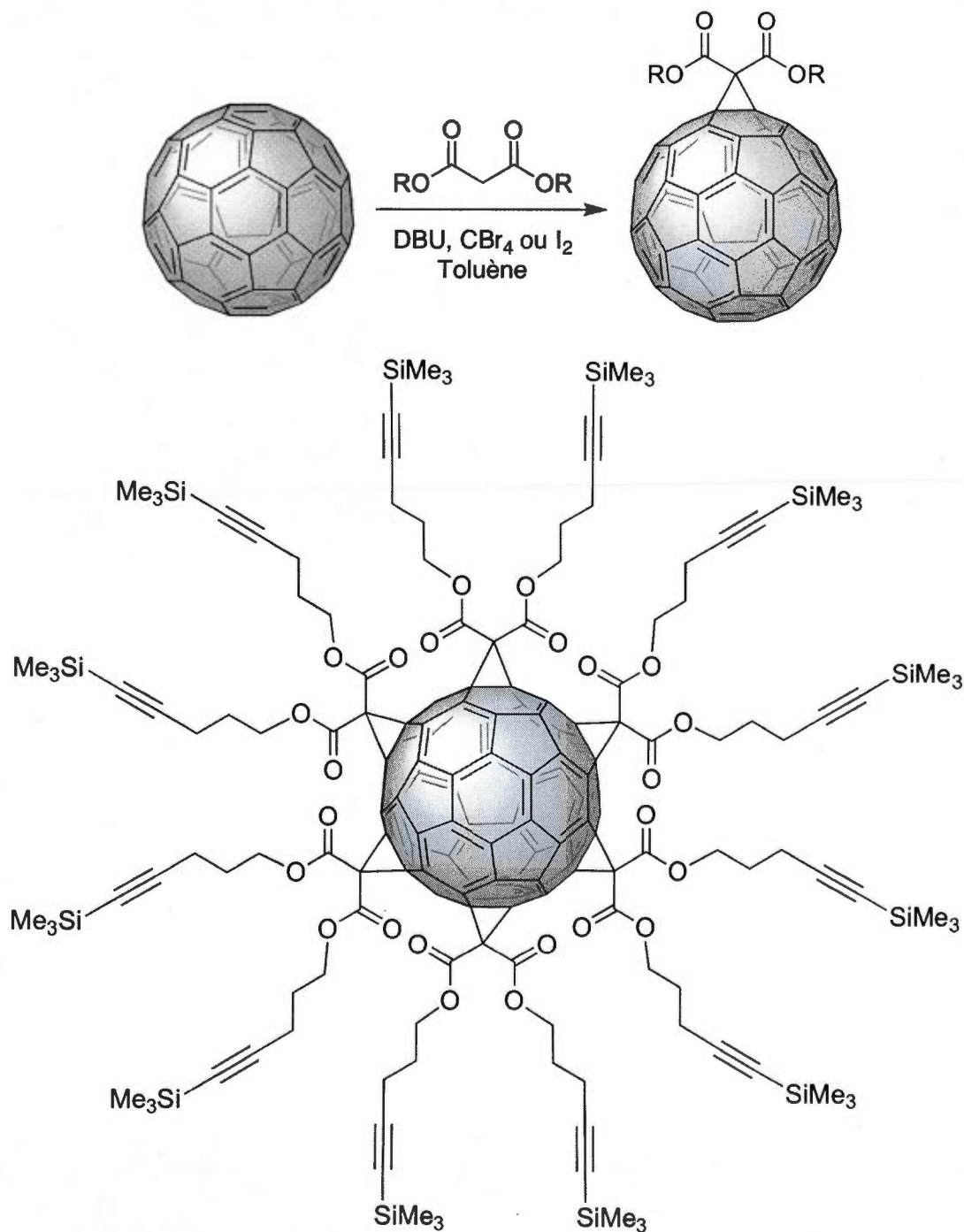


Figure 4.8: Schéma réactionnel de la réaction de cyclopropanation Bingel-Hirsch et structure d'un fullerène hexavalent (*tirés de Nierengarten et al., 2010*).

4.1.9 Les fulléroglyco "clusters"

Les carbohydrates ou polysaccharides sont des molécules naturelles qui se retrouvent à la surface de la majorité des cellules des mammifères. Ils sont des transducteurs de signaux et sont responsables des communications entre les mondes intérieur et extérieur des cellules. Les carbohydrates ont la possibilité d'interagir avec les glycoprotéines, les glycolipides et les protéoglycans. Mais surtout, c'est l'interaction carbohydrate-protéine qui joue un rôle clé dans la plupart des processus naturels de la cellule (Chabre et Roy, 2010). Cette interaction individuelle est faible et peu sélective et est, de plus, dépendante des différents ions présents dans les cellules. L'association coopérative, simultanée et spécifique de plusieurs ligands (épitopes) entre une structure moléculaire et un récepteur biologique spécifique crée un effet synergique appelé "*glycocluster*" ou "*dendritic effect*". Par conséquent, la présence d'un grand nombre d'unités de polysaccharides sur une supramolécule augmente de façon exponentielle la force de son interaction avec la cellule cible, ou avec les lectines par exemple (Chabre et Roy, 2010; Nirengarten et al., 2010).

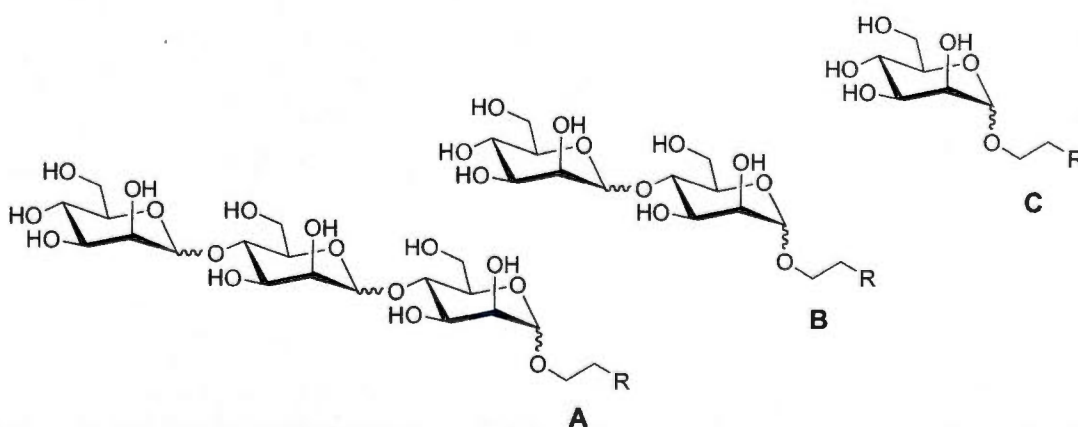


Figure 4.9: Structures (A) d'un trisaccharide; (B) d'un disaccharide et (C) d'un monosaccharide.

Les glycofullerènes sont des molécules à base de fullerène sur lesquels une ou plusieurs unités de saccharides ont été greffées de façon covalente sur la périphérie du C_{60} (Chabre et Roy, 2010). Ces dérivés sont fortement hydrosolubles, ont des propriétés photoactives, sont donneurs ou accepteurs d'électrons et peuvent agir comme une "éponge" à radicaux libres. Aussi, ils ont une importante force de cohésion, ce qui leur permet de s'auto-assembler et de former des supramolécules. À l'aide de modifications structurales, il est possible de moduler l'architecture dendritique de ces supramolécules, de créer un effet de synergie causé par la présence de ligands multivalents et de faire du biomimétisme moléculaire, pour "mimer" la fonction naturelle des polysacharrides (Nakamura et Isobe, 2003; Chabre et Roy, 2010).

Les premiers glycofullerènes monovalents ont été synthétisés en 1992 (Vasella et al., 1992) et les carbohydrates étaient alors greffés à la surface des fullerènes en une étape par l'addition de carbène et par la cycloaddition thermique d'un azoture en présence du C_{60} . Les produits obtenus par ces méthodes sont des dérivés du type spiro-glycosyl méthanofullerène énantiomériquement purs et deux isomères du N- β -glycopyranosyl [5,6] azafulléroïde respectivement (Chabre et Roy, 2010). Ces réactions permettent d'introduire des unités dérivées du mono-D-glucopyranose, du mono-D-galactopyranose, du lactose, du maltose et de certains trisaccharides dans un rendement variant de 15 à 28%.

Aussi, la réaction de Prato (Maggini et al., 1998) entre un aldéhyde dérivé d'un carbohydrate, la sarcosine et le C_{60} (Dondoni et Marra, 2002) a originalement permis de former des produits de mono-addition du type fulléroglycopyrrolidine. Dondoni et Maran (2002) ont rapporté l'introduction des unités galactopyranoses, glucopyranoses et mannofuranoses à partir de la condensation de leur dérivé 1-déoxy-1-C-formylé (Chabre et Roy, 2010) en très faible rendement (10-14%). Cette méthode permet de synthétiser avantageusement des dérivés monovalents du fullerène contenant une unité 6-(β -D-glycopyranosylamino)pyrimidin-4-one. La méthodologie de Prato est considérée comme un outil extrêmement flexible et versatile dans la chimie du fullerène (Prato et Maggini, 1998; Kordatos et al., 2001).

L'avancement de nouvelles méthodologies permet de synthétiser des fulléropyrrolidines plus complexes et de contrôler la stoechiométrie pour favoriser les produits de bis- et de tris- addition (Kordatos et al., 2001; Marchesan et al., 2005). Les glycofullérènes multivalents ont été synthétisés pour la première fois *via* la cycloaddition [3+2] entre un mannoside substitué par un groupement 2-azidoéthyle en position anomérique et le C_{60} (Fig.4.10) (Kato et al., 2001). Ce couplage thermique est de type cycloaddition 1,3-dipolaire et permet de synthétiser en faible rendement un mélange de trois produits contenant deux isomères issus de la mono-addition (19%) et un produit unique issu de la bis-addition (10%). Ces glycofullérènes sont ensuite convertis en fullerénols à l'aide d'un traitement aqueux à l'hydroxyde de sodium en présence du TBAOH (l'hydroxyde de tétrabutylammonium), un agent de transfert de phase utilisé en quantité catalytique. Ces fullerénols bis-mannosylés sont très solubles dans l'eau et ont la capacité de diminuer l'agrégation typique du fullerénol avec les érythrocytes et avec les protéines spécifiques aux β -galactosides (Bosi et al., 2003).

L'évolution de nouvelles stratégies de synthèse plus efficaces, avec de meilleurs rendements et plus de régiosélectivité, a permis d'introduire des unités de polysaccharides ramifiées sous une architecture dendritique contenant généralement de deux à trois sucres: des glycodendrons (Mateo-Alonso et al., 2006; Chabre et Roy, 2010). Dans cette approche dite "convergente", les fulléroglycodendrimères amphiphiles produits ne sont pas symétriques et ont la propriété de s'auto-assembler et de former des films du type de Langmuir (Kato et al., 2007; Chabre et Roy, 2010). La cycloaddition thermique entre un azidodendron et le C_{60} permet de faire l'addition d'un ou de deux glycodendrons connectés de façon régiosélective *via* la formation de deux ponts imino adjacents sur une jonction de cycle 6,6 du C_{60} (Fig.4.10) (Kato et al., 2007). La méthode de cyclopropanation de Bingel-Hirsch (Camp et Hirsch, 1997) est très utilisée pour introduire des glycodendrons dérivés de l'acide malonique sur la sphère du fullerène *via* la formation d'un lien de type cyclopropane sur le C_{60} (Chabre et Roy, 2010; Nierengarten et al., 2010).

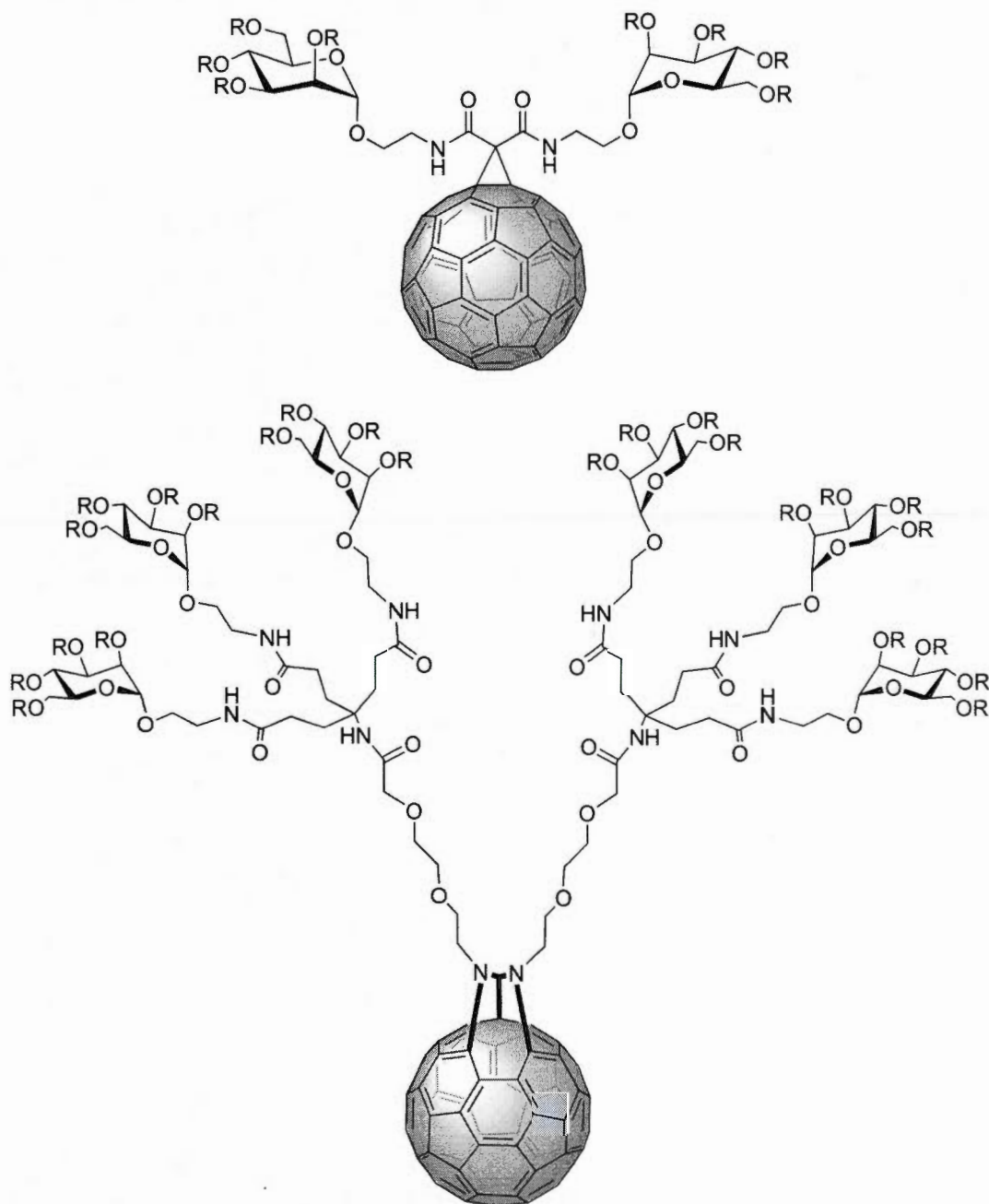


Figure 4.10: Structures d'un fullerène amphiphile bis-mannosylé préparé par la méthode de Bingel-Hirsch (figure du haut) (*tirée de Kato et al., 2001*) et d'un fulléroglycodendrimère amphiphile (figure du bas) (*tirée de Kato et al., 2007*).

Dans la réaction de Bingel-Hirsch, il est possible de contrôler la stoechiométrie des réactifs et d'introduire d'une à six unités maloniques en une seule étape sur le C_{60} (Fig.4.8 et 4.11) (Hirsch et al., 1994; Chabre et Roy, 2010). L'addition des substituants se fait préférentiellement aux jonctions de cycles 6,6 du C_{60} et un seul isomère est obtenu. Les fulléroglyco "clusters" hexavalents synthétisés dans les conditions de Bingel-Hirsch sont des composés sphériques, symétriques et sont communément appelés les "sugar balls" (Fig.4.11).

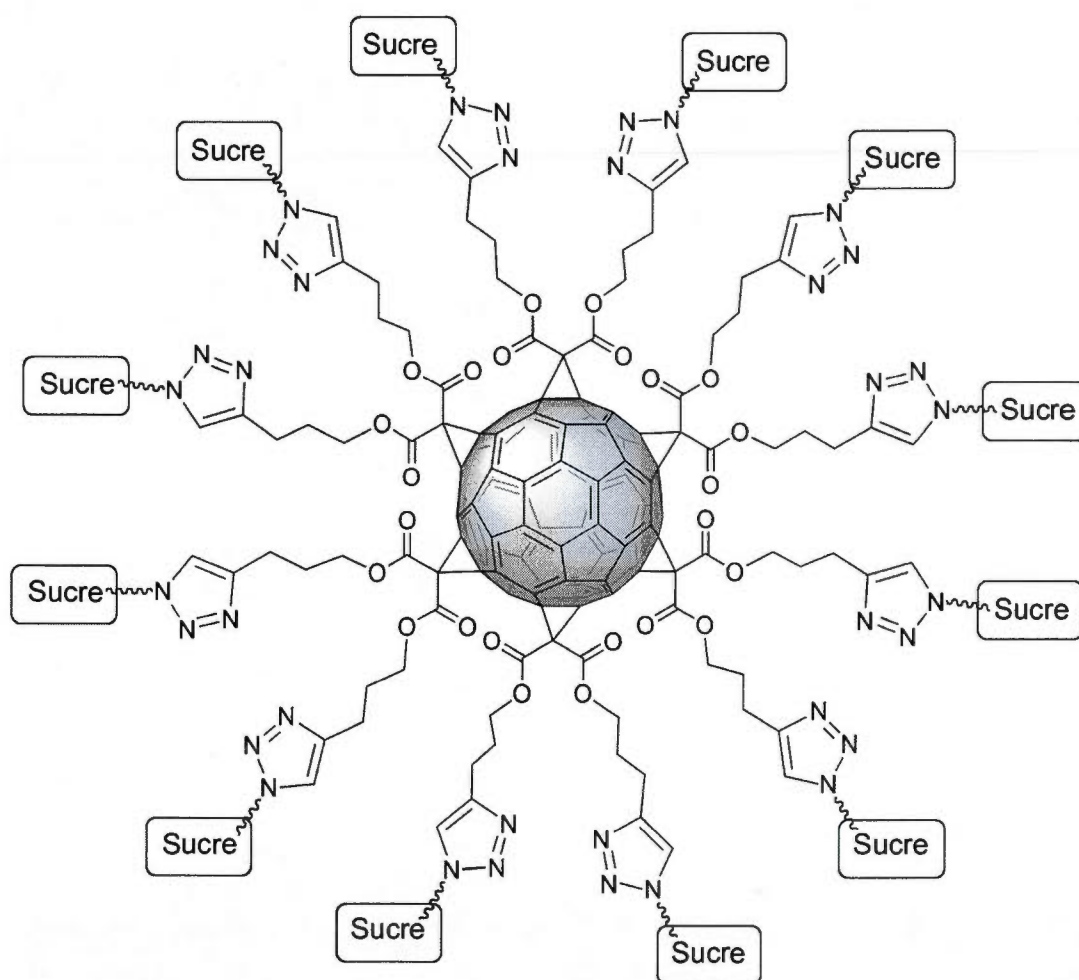


Figure 4.11: Structure d'un fullerène hexavalent du type "sugar ball" (tirée de Nierengarten et al., 2010).

La découverte fortuite de l'addition sélective et multiple d'arylcupriens sur le fullerène par le groupe de Nakamura en 1996 (Sawamura et al., 1996) a été un moment clé qui a permis de développer une nouvelle stratégie de synthèse donnant accès aux dérivés pentavalents du fullerène (Matsuo et Nakamura, 2008). L'introduction sélective et symétrique de cinq groupements thioaryle sur le C_{60} , permet de greffer en une deuxième étape subséquente des carbohydrates *via* une substitution nucléophile entre les thiolates et des dérivés du type 2-bromoéthyle glycoside (Isobe et al., 2003). Cette approche directe donne uniquement un isomère structurel du C_{60} et offre l'avantage de greffer des sucres non protégés dans un milieu aqueux (Fig.4.12).

Cependant, la réaction est limitée par un faible rendement et souvent des mélanges de produits sont obtenus lorsque les glycosides augmentent en taille et en complexité. Une approche complémentaire utilise le greffage d'un "*linker*" ou "*spacer*" fonctionnalisé sur les thiolates (Isobe et al., 2007). De cette façon, les thiolates sont substitués par des propargyles en périphérie du fullerène et à l'aide de la "*Click chemistry*", les carbohydrates individuels ou des glycodendrons sont introduits en grand nombre.

Les "*sugar balls*" synthétisés par la méthode de Bingel-Hirsch (Fig.4.11) et par l'addition multiple d'organocupriens (Fig.4.12) sont des supramolécules sphériques et multivalentes du C_{60} contenant généralement de cinq à quinze unités réparties symétriquement autour du noyau fullerène (Isobe et al., 2007; Nirengarten et al., 2010). Ces supramolécules peuvent faire de l'auto-assemblage à l'échelle du nanomètre (Kato et al., 2007) et démontrent une activité biologique basée sur l'interaction synergique carbohydrate-protéine (Durka et al., 2010; Chabre et Roy, 2010; Nierengarten et al., 2010).

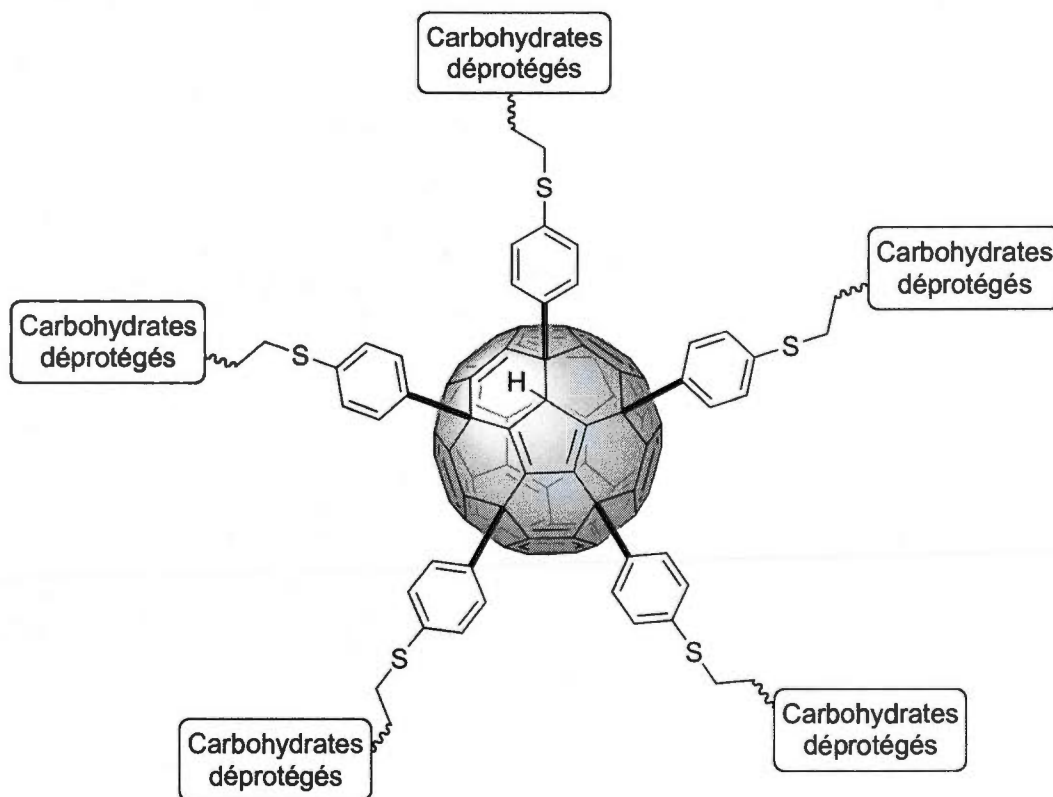


Figure 4.12: Structure d'un fullerène pentavalent de la catégorie des "sugar balls" préparé via l'addition multiple d'organocupriens (tirée de Chabre et Roy, 2010).

4.2 Stratégie: Plan de synthèse

L'approche synthétique est schématisée dans la figure 1.8.

4.2.1 La réaction de Williamson

La substitution des 24 unités hydroxylées ou bromées en périphérie du fullerène dans les conditions de Williamson est une stratégie attirante qui permet d'introduire en une étape des fonctions propargyle ou azoture. Cette approche permet par la suite de greffer des unités bioactives à l'aide de la "Click chemistry". La réaction classique de Williamson (1850) est une réaction de type S_N2 entre un

alcool et un bromure d'alkyle en présence d'une base. L'intermédiaire impliqué est un ion alcoolate réactif et le produit de la réaction est un éther substitué. La préparation de l'ion alcoolate se fait généralement *in situ* à l'aide de bases telles l'hydroxyde ou le carbonate de potassium. L'utilisation d'agent de transfert de phase et la présence de sels d'iodes solubles permet d'accélérer la cinétique de la réaction (Weissberg et al., 2001) et d'introduire des groupements fonctionnels moins réactifs.

Le fullerénol a un pK_a estimé à 12,9 (Hinokuma et Ata, 2001) et par conséquent une base forte est nécessaire pour favoriser la déprotonation et son alkylation. Par contrainte géométrique, la substitution de type S_N2 est impossible dans le cas du bromofullerène. Dans ce genre de substitution nucléophile, l'attaque se fait à 180° sur le groupement partant. Par conséquent, la forme sphérique du fullerène annule la possibilité d'une approche par le centre du C_{60} . Une variation de cette substitution, où l'attaque de l'alcoolate se fait à 120° sur une double liaison de géométrie planaire en β du groupe partant (Br-) explique le produit obtenu. Ce type de substitution est de type S_N2' (Fig.4.13) (Bordwell et al., 1960).

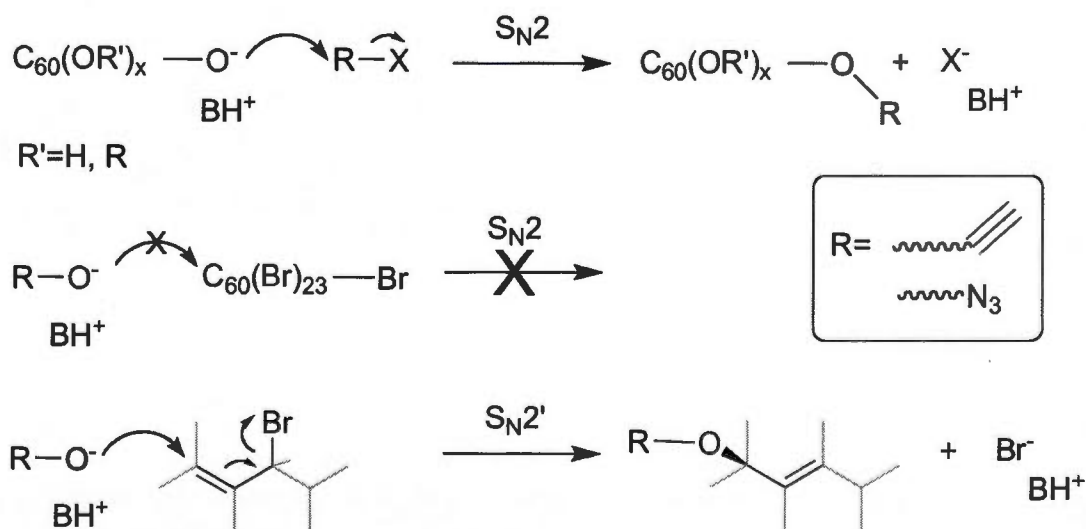


Figure 4.13: Mécanismes de la réaction d'éthérification de Williamson pour les dérivés du C_{60} .

4.2.2 La réduction de Staudinger

La réduction de Staudinger a été développée en 1919 par Staudinger et Meyer (Bräse et al., 2005). La procédure permet la réduction sélective de la fonction azoture en amine primaire en présence d'une phosphine. Le mécanisme de la réaction implique l'attaque de la phosphine sur l'azote terminal pour former un intermédiaire phosphazine. Cet intermédiaire se dégrade spontanément et libère une molécule d'azote gazeux pour former un iminophosphorane tel qu'illustré à la figure 4.14.

En présence d'eau, l'imino-phosphorane s'hydrolyse spontanément en amine primaire. Le produit secondaire de la réaction est l'oxyde correspondant à la phosphine. La triphénylphosphine, un puissant agent réducteur, est couramment utilisé pour effectuer cette transformation. Le produit secondaire obtenu est l'oxyde de la triphénylphosphine (Golobov et al., 1981). Cette méthode de réduction est très douce et efficace et permet de convertir plusieurs fonctions azoture présentes sur la molécule ou la macromolécule en présence d'autres fonctions chimiques plus sensibles comme les doubles liaisons du fullerène et les liens éthyliques du fullerénol (Golobov et al., 1981; Vaultier et al., 1983; Bräse et al., 2005).

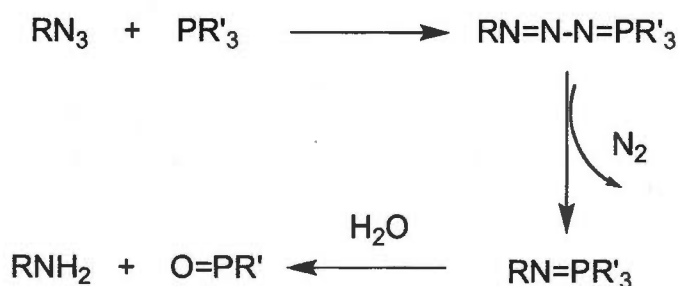


Figure 4.14: Mécanisme de la réduction de Staudinger (*tiré de Vaultier et al., 1983*).

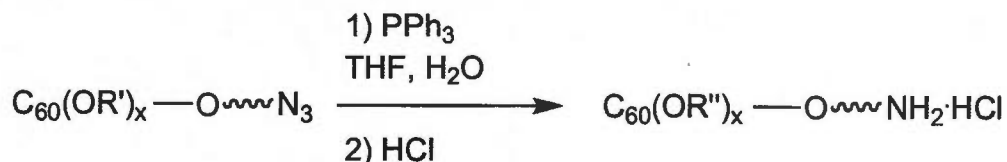


Figure 4.15: Approche synthétique pour la synthèse d'un fullerène polycationique préparé avec la méthode de réduction des azotures de Staudinger.

Dans le but de synthétiser un fullerène polycationique soluble dans l'eau, la réduction de Staudinger est utilisée pour la réduction d'un précurseur polyazidofullerène développé par la méthode de Williamson (Fig.4.15). Le succès de cette synthèse repose sur la conversion quantitative de toutes les fonctions azoture. L'étude de la cinétique de la réaction de Staudinger et le contrôle de la stoechiométrie des réactifs permettent d'optimiser la conversion, et ensuite les fonctions polyamines sont converties en fonctions ammonium, solubles dans l'eau, à l'aide de l'acide hydrochlorhydrique gazeux.

4.2.3 La "Click chemistry"

La "Click chemistry" est un concept introduit par Barry K. Sharless (Kolb et al., 2001) qui décrit une approche synthétique basée sur l'assemblage rapide et efficace d'unités modulaires préfabriquées. Le concept s'inspire du fait que la nature utilise aussi cette approche pour assembler des unités et créer des macromolécules plus complexes (Chabre et Roy, 2010). Une des réactions les plus populaires de la "Click chemistry" est la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture et une alcyne (Huisgen, 1963) catalysée par le cuivre (I) (Fig.4.16). Cette cycloaddition de type [3+2] se démarque par des hauts rendements, sa stéréospécificité, la

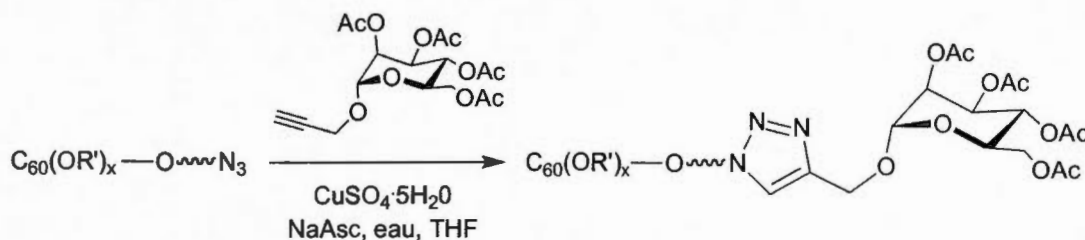


Figure 4.16: Approche synthétique pour la synthèse d'un fullerène polymannosylé ("sugar ball") préparé à l'aide de la "Click chemistry".

formation d'un triazole physiologiquement stable et la formation de produits secondaires inoffensifs. De plus, ce type de cycloaddition est favorisé thermodynamiquement et une large force motrice de 84 KJ/mol favorise la formation d'un seul produit isolable par cristallisation ou distillation (Kolb et al., 2001). Cette approche est largement utilisée dans la chimie des glycofullerènes (Chabre et Roy, 2010; Nierengarten et al., 2010) pour introduire les unités de carbohydrates en périphérie du fullerène. De cette façon, nous proposons d'introduire des dérivés propargylés de la famille du D-mannose autour d'un coeur de fullerène contenant plusieurs fonctions azoture *via* la formation d'un triazole (Fig.4.16).

4.2.4 Calcul des ratios sécuritaires carbone/azote

Le fullerène est un composé riche en carbone et l'introduction de plusieurs groupements azoture en périphérie crée de la tension dans le cycle et modifie la stabilité thermique de la molécule. De leur côté, les azotures sont des molécules énergétiques et instables qui peuvent libérer spontanément de l'azote gazeux. Les azotures organiques sont sensibles aux chocs et la friction. En présence de carbone, un mélange potentiellement explosif est formé, par conséquent, des précautions sont nécessaires lors du design et de la manipulations de ces composés (Bräse et al., 2001). La stabilité des composés organiques à haute teneur en azoture varient en fonction du ratio carbone/azote de ces composés. En règle générale, les azotures

organiques avec des C/N supérieur à un et inférieur à trois peuvent être synthétisés et isolés en laboratoire. Les composés dont le C/N est inférieur à un ne doivent pas être isolés. Ils peuvent être générés *in situ* ou agir comme intermédiaire réactionnel (Carlmark et al., 2009). Alternativement, lors du design d'une molécule au potentiel énergétique, il est courant de diluer le nombre de fonctions énergétiques par la "règle de six": six atomes de carbone (ou l'équivalent en masse) pour chaque fonction énergétique (azoture, nitro ou diazo). De cette façon, les composés sont moins instables et leur manipulation est plus sécuritaire (Kolb et al., 2001).

4.2.5 Évaluation du nombre de substituants en périphérie du fullerène

L'analyse thermogravimétrique (TGA) est une méthode de pyrolyse simple et efficace qui permet d'estimer rapidement le nombre de substituants en périphérie du fullerène (Goswami et al., 2004; Singh et Goswami, 2011). Lors de la pyrolyse du fullerène, Goswami et ses collaborateurs ont établi que le pourcentage de masse perdu dans l'intervalle 150-570°C correspondait à la masse ajoutée en périphérie du C₆₀, tandis que le pourcentage de masse perdue aux températures supérieures à 570°C, incluant la masse de la suie résiduelle, correspondait à la masse du noyau C₆₀. La méthode permet d'estimer le nombre d'unités hydroxylées et d'unités organiques sur des polymères et des macromolécules de C₆₀, indépendamment de la nature des substituants. En calculant les pourcentages de perte de masse à partir des thermogrammes et en utilisant le ratio des masses molaires du C₆₀ (720 g/mol) et du groupement attaché M (g/mol), il est possible d'estimer rapidement le nombre d'unités en périphérie avec l'équation 4.1, où x correspond au pourcentage de perte de masse des substituants dans l'intervalle 150-570°C, et y, le pourcentage de perte de masse correspondant au charbon incluant la suie:

$$\# \text{ substituants} = \frac{720 * x}{y * M} \quad (4.1)$$

Aussi, le comportement thermique et les mécanismes de dégradation thermique lors de la pyrolyse contrôlée sont différents selon la composition chimique des substituants. Par conséquent, les profils de dégradation des thermogrammes sont des empreintes "thermiques" et permettent d'identifier ou de confirmer la nature et la présence des substituants avec précision (Pfeil et Löbbecke, 1997).

4.3 Résultats/Discussion

4.3.1 Synthèse du précurseur $C_{60}(OH)_n(OCH_2CH_2N_3)_{10}$

À partir du bromofullerène synthétisé en laboratoire (99%, Djordjevic et al., 1998), des essais préliminaires ont vite démontré la difficulté de créer des nouveaux liens du type éther de fullerénols dans les conditions de la réaction de Williamson (Fig.4.17).

Plusieurs conditions réactionnelles ont été étudiées et toutes les tentatives d'introduire le groupement propargyle ont échoué. Les bases organiques telles la pyridine, la diisopropyléthylamine (DIPEA) et la triéthylamine ont des pK_a modérés et elles ne sont pas assez fortes pour déprotoner l'alcool propargylique et favoriser l'alkylation, même à reflux pendant deux jours. L'utilisation d'un excès d'hydrure de

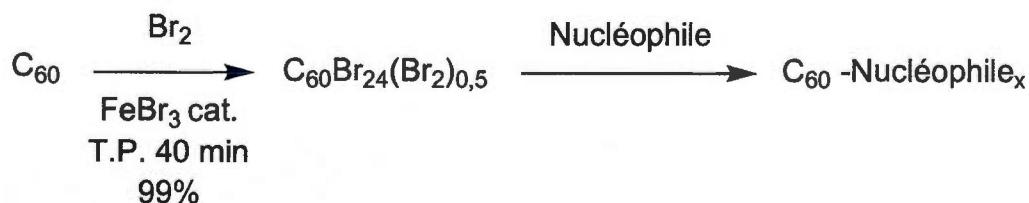


Figure 4.17: Approche synthétique pour la synthèse d'un fullerène polysubstitué préparé à l'aide de la réaction de Williamson sur le bromofullerène.

sodium (NaH) pour déprotoner l'alcool propargylique n'a pas permis de favoriser la réaction et une substance insoluble était formée dans ces conditions. De meilleurs résultats ont été obtenus avec l'utilisation du 2-azidoéthanolate de sodium ou de lithium dans un excès de 2-azidoéthanol fraîchement préparé selon le protocole de Lu et Bittman (2005). De cette façon, le bromofullerène réagit lentement à la température de la pièce avec le nucléophile (S_N2') et un mélange d'hydroxy et d'éthers polysubstitués du fullerène est obtenu après trois jours de réaction avec des rendements variant de 34-45% (Tableau 4.1).

Par mesure de sécurité, l'utilisation de la base NaH est exclue de nos recherches, car en présence du 2-azidoéthanol, un mélange pyrophorique est formé et plusieurs incidents de nature hasardeuse sont survenus en laboratoire. Le 2-azidoéthanol ($C_2H_5N_3O$) a un ratio carbone/azote ~ 1 , par conséquent ce composé ne devrait jamais être synthétisé et isolé à une échelle de plus de cinq grammes (Bräse et al., 2005), ni être en contact avec des substances pyrophoriques comme le NaH. L'utilisation du butyllithium (*n*-Buli) en solution 2,5M dans l'hexane est beaucoup plus appropriée pour effectuer la préparation *in situ* du nucléophile dans un excès de 2-azidoéthanol.

Tableau 4.1: Conditions réactionnelles pour la synthèse d'un fullerène polysubstitué préparé à l'aide de la réaction de Williamson sur le bromofullerène

Nucléophile	Rendement (%)	Conditions
$+Li^+O-CH_2CH_2N_3$	45	T.P. 3 jours; 2-azidoéthanol/ <i>n</i> -BuLi (100 éq.)
$+Na^+O-CH_2CH_2N_3$	34	T.P. 3 jours; 2-azidoéthanol/ NaH (100 éq.) Note: pyrophorique
$+Na^+O-C\equiv C-$	0 0	T.P. 7 jours; propargyle alcool/ NaH (100 éq.) Reflux 48 hres

Le progrès de la réaction de Williamson entre le bromofullerène et le 2-azidoéthanolate de lithium est suivi par l'apparition de la bande intense des azotures à 2086 cm^{-1} en ATR et par le nombre de substituants calculé à partir des thermogrammes (Fig.4.19 et Tableau 4.2). L'ATR offre l'avantage de pouvoir monitorer les bandes infrarouge des solides rapidement sans la manipulation de l'échantillon et son usage permet d'éviter la préparation complexe d'une pastille à base de NaCl ou de KBr. Dans les conditions optimales (sept jours, 100 éq. de *n*-BuLi), un produit orangé (**2**) qui se démarque par sa très grande solubilité dans les solvants organiques usuels est isolé à 58% de rendement et 97% de pureté (Fig.4.18 et Tableau 4.2).

La présence de deux signaux larges à 3,9 et 3,5 ppm en RMN ^1H et à 61,9 et à 51,0 ppm en RMN ^{13}C (Fig.4.20 et 4.21) confirme la présence des groupements éthylène dans le composé **1**. Le spectre de RMN ^{13}C du composé **1** manque de résolution, par conséquent il est difficile d'identifier clairement les signaux appartenant au coeur C_{60} dans la région de 150 ppm.

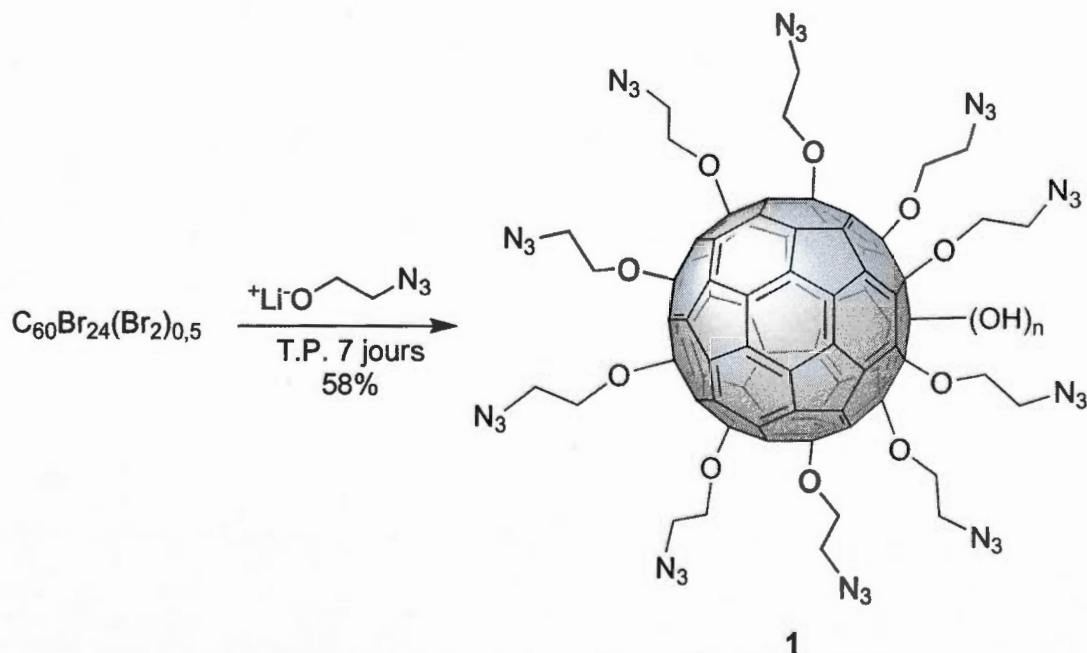


Figure 4.18: Synthèse de **1** à partir du bromofullerène et du 2-azidoéthanolate de lithium.

Aussi, la difficulté de phaser correctement la ligne de base dans le spectre de RMN ^{13}C de **1**, souligne la difficulté d'analyser ce type de dérivés du fullerène avec la résonance magnétique nucléaire. Les dérivés polysubstitués du fullerène du type fullerénol sont paramagnétiques. Le phénomène d'agrégation et le manque de solubilité du composé **1** dans le chloroforme deutéré limitent grandement l'analyse de RMN ^{13}C , beaucoup moins sensible que l'analyse de RMN du proton. En ATR (Fig.4.22 et Tableau 4.3), les elongations CH_2 asymétrique et symétrique sont observées à 2928 et 2877 cm^{-1} respectivement et un signal intense à 2086 cm^{-1} est observé pour les azotures. Aussi, les elongations à 1652 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ du fullerène), 1284 cm^{-1} (ν_{asy} C-O éther), 1078 cm^{-1} (ν_{sym} C-O éther) et 1012 cm^{-1} (C-N) confirment la structure proposée de **1**.

De faibles signaux attribués aux fonctions -OH sont observables en RMN ^1H (4,4 ppm) et en ATR (OH-stretching: 3400 cm^{-1} ; bending: 1438 cm^{-1} ; out-of-plane: 646 cm^{-1}), tels qu'illustrés aux figures 4.21 et 4.22 et révèlent la présence d'hydroxy sur le C_{60} . Leur nombre est indéterminé et ces fonctions n'étaient pas présentes sur la molécule au départ de la réaction. Un mécanisme secondaire de la réaction impliquant la β -élimination des substituants catalysée par la déprotonation des protons acides en α des azotures et la formation d'un dérivé de l'éthylène expliquerait la formation des hydroxy dans cette réaction. Aussi, d'hydroxylation directe entre l'eau et les bromes résiduels du fullerène dans les conditions basiques de la réaction ou de l'étape de neutralisation serait un mécanisme possible pouvant expliquer la présence des hydroxy dans **1**.

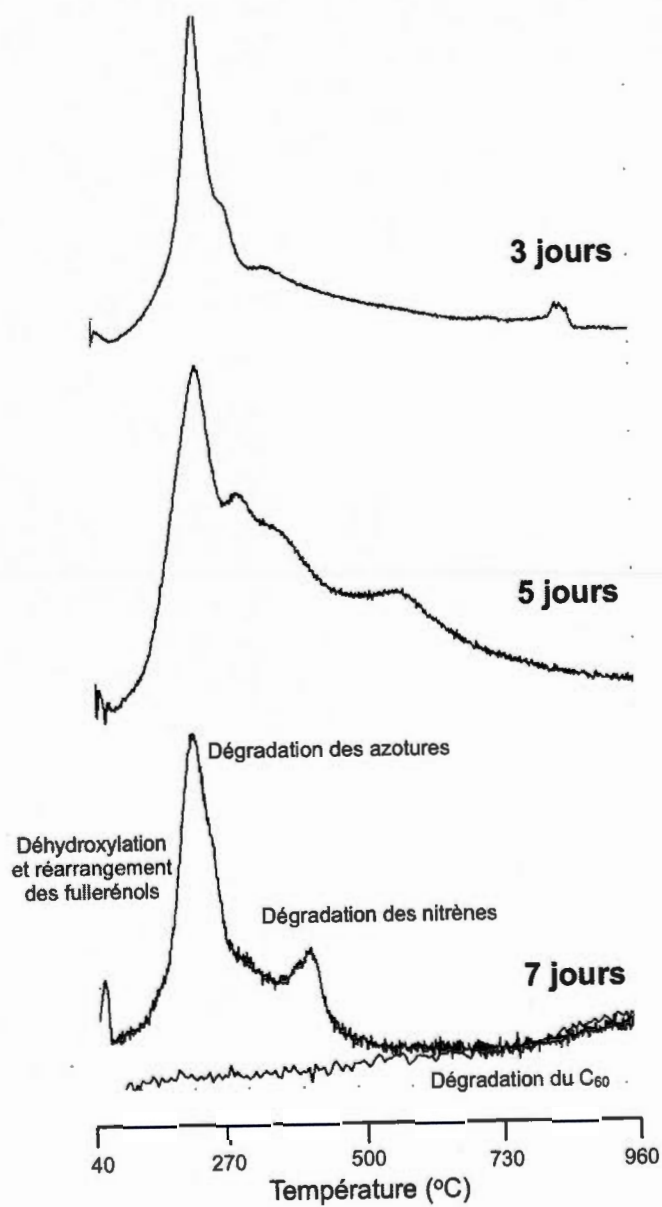
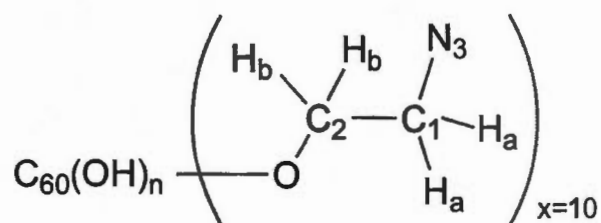


Figure 4.19: Cinétique de la synthèse de **1** suivie par analyse thermogravimétrique (TGA).

Tableau 4.2: Rendements cumulatifs de la synthèse de **1**

Temps (jours)	Rendement (%)	# Substituants (TGA)	Pureté (%)	TGA: Intervalle de température (°C)		
				100-150	150-570 (x)	>570 + suie (y)
				Perte de masse (%)		
1	<15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	45	7	95	1	43	52
5	56	9.5	96	2	51	45
7	58	10	93	2	50	43

n.d.: non disponible à cause des faibles rendements obtenus.



Noyau	δ (ppm)	Description	Attribution
^2H	3,5	singulet large	H_b
	3,9	singulet large	H_a
	4,4	épaulement	$(\text{OH})_n$
^{13}C	51,0	singulet	C_2
	66,7	singulet large	C_1
	150	épaulement	C_{60}

Figure 4.20: Structure proposée de **1** et attribution des déplacements chimiques de RMN.

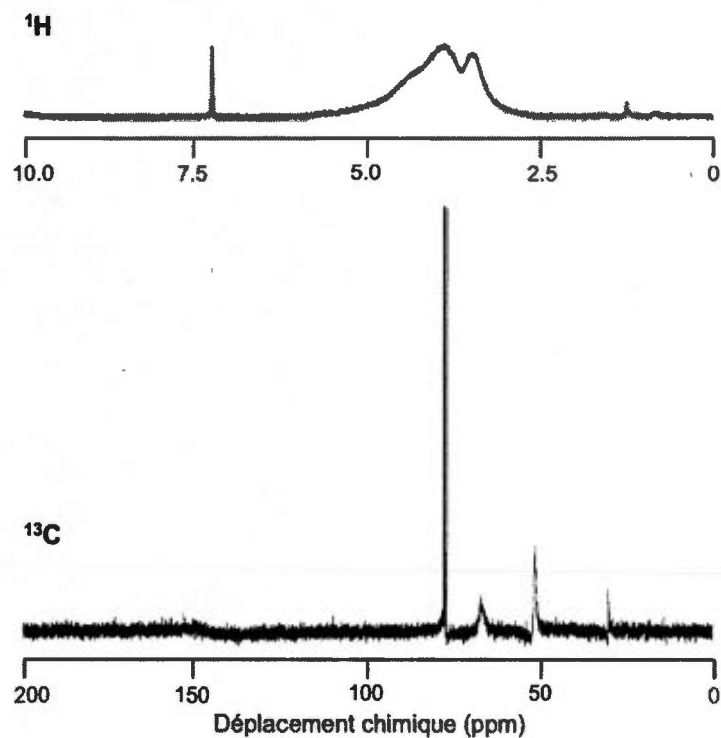


Figure 4.21: Spectres de RMN ^1H et ^{13}C de 1 (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C ; CDCl_3 , δ , ppm).

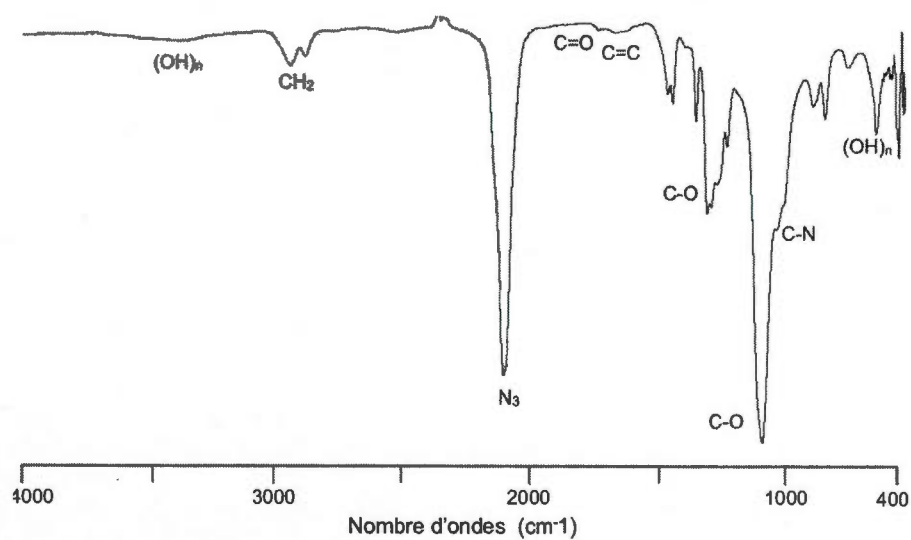


Figure 4.22: Spectre d'ATR de 1.

Bien que l'introduction des fonctions hydroxy soit imprévue, leur présence n'est pas incompatible avec les conditions de la réduction de Staudinger et de la chimie du type "Click" proposées pour la suite des transformations synthétiques. La faible intensité des signaux en RMN et en ATR attribués aux fonctions hydroxy suggère une présence mineure de ces fonctions et leur masse est négligée dans les calculs du nombre de substituants greffés en périphérie de **1**.

Une étude approfondie des bandes d'élongation en ATR (Fig.4.22) de **1** révèle trois bandes discrètes dans la région des fonctions carbonyle. Ces bandes sont des impuretés typiques des fullerénols polysubstitués et sont attribuées à la présence de cétone, d'hémicétale ou de l'ion carboxylate sur le fullerène, respectivement à 1720, 1634 et 1620 cm^{-1} (Tableau 4.3). Les fullerénols polysubstitués sont instables et peuvent se réarranger ou s'oxyder (Xing et al., 2004). Le réarrangement de type Pinnacol de deux fonctions hydroxy vicinales sur le fullerénol est possible dans les milieux fortement basiques. (Xing et al., 2004) et explique la présence du groupement carbonyle, tandis que la présence des hémicétales proviendraient de l'équilibre céto-énol des fonctions hydroxy vicinales (Chiang et al., 1994; Kokubo et al., 2008) du fullerénol. Aussi de faibles signaux sont visibles à 1250, 1180, 1140, 1080, 1050, 960, 930, 850, 730, 560 et 550 cm^{-1} et sont attribués aux bandes d'élongations typiques des atomes résiduels de brome sur le C_{60} (Djordjevic et al., 1998). La réaction de Williamson est incomplète et quelques atomes de brome sont encore présents sur la molécule.

Les thermogrammes du fullerène, du bromofullerène et de **1** sont illustrés à la figure 4.23. En chauffant l'échantillon sous azote, le noyau C_{60} se sublime aux alentours de 570°C et le fullerène commence à se décomposer et à former de la suie résiduelle aux alentours de 800 °C. Le bromofullerène se décompose en C_{60} et en Br_2 et son profil de dégradation thermique est symétrique autour de son maximum à 165 °C. La masse en brome perdue entre 100 °C et 230 °C est de 73,1 % et représente une formule empirique contenant environ 25 atomes de brome dont 24 sont liés de façon covalente avec le fullerène. Le thermogramme de **1** a le profil de dégradation des composés énergétiques du type polyazoturé (Pfeil et Löbbecke,

1997). En effet, les thermogrammes de ces composés contenant plusieurs fonctions azoture sont caractérisés par un mécanisme de dégradation thermique séquentiel en deux étapes: la dégradation des azotures (230°C) et la dégradation des nitrènes (450°C).

Tableau 4.3: Élongations principales de **1** en ATR

Vibrations caractéristiques	Fonction	Fréquence de vibration (cm ⁻¹)	Attribution
O-H <i>élongation</i> <i>déformation</i>	alcool	3430 1438 646	(OH) _n
C-H <i>élongation</i> <i>déformation</i>	alcane	2928 (v _{asy}) 2877 (v _{sym}) 1456 1346 1168 728	CH ₂
N ₃ <i>élongation</i> C-N <i>élongation</i>	azoture	2086 1012	N ₃ liens CH ₂ -N ₃
C=C <i>élongation</i>	alcène	1652	C ₆₀
C-O <i>élongation</i>	éther	1284 (v _{asy}) 1078 (v _{sym})	liens C ₆₀ -O-CH ₂
C=O <i>élongation</i>	cétone	1717	C ₆₀ impureté
C-O <i>élongation</i>	hémicétale	1634	C ₆₀ impureté
C-O <i>élongation</i>	carboxylate	1620	C ₆₀ impureté

Aussi, le thermogramme de **1**, montre clairement le début de la décomposition autour de 125 °C contrairement à la valeur de 150 °C rapportée par Singh et Goswami (2011) pour les dérivés du fullerénol. Cette différence est expliquée par la présence de brome résiduel qui commence à se décomposer à des températures inférieures, autour de 100-125 °C (Fig.4.23). Il est possible de calculer le nombre de substituants en périphérie du C₆₀ à partir du thermogramme et de l'équation 4.1 (Singh et Goswami, 2011). En attribuant la valeur x=50 au pourcentage de perte de masse du composé dans l'intervalle 150-570°C et la valeur y=43 au pourcentage de perte de masse en haut de 570°C incluant la suie (Tableau 4.2), à l'aide du ratio des poids moléculaires du C₆₀ (720 g/mol) et d'une unité -OCH₂CH₂N₃ (86 g/mol), le nombre de substituants est estimé à dix:.

$$\# \text{ substituants} = \frac{720 \times 50}{43 \times 86} = 10 \quad (4.2)$$

De la même façon, en considérant x=2%, la perte de masse associée au brome entre 100-150°C et en utilisant la masse molaire du brome (79,9 g/mol), il est possible d'évaluer leur nombre à environ 0,5 atome de brome par molécule de C₆₀. L'échantillon contient aussi 5% d'impuretés observables sur le thermogramme et correspond à la masse perdue avant 100°C, incluant l'eau et les solvants volatiles. La pureté de l'échantillon est de 93% (x+y=50+43=93). La formule empirique approximative de **1** est C₈₀H₄₀N₃₀O₁₀ et sa masse molaire est d'environ 1580 g/mol, par conséquent le ratio C/N ≈3. Ce composé polyazidofullerène est de la classe des matériaux énergétiques (Bräse et al., 2005) et devrait être manipulé avec précautions.

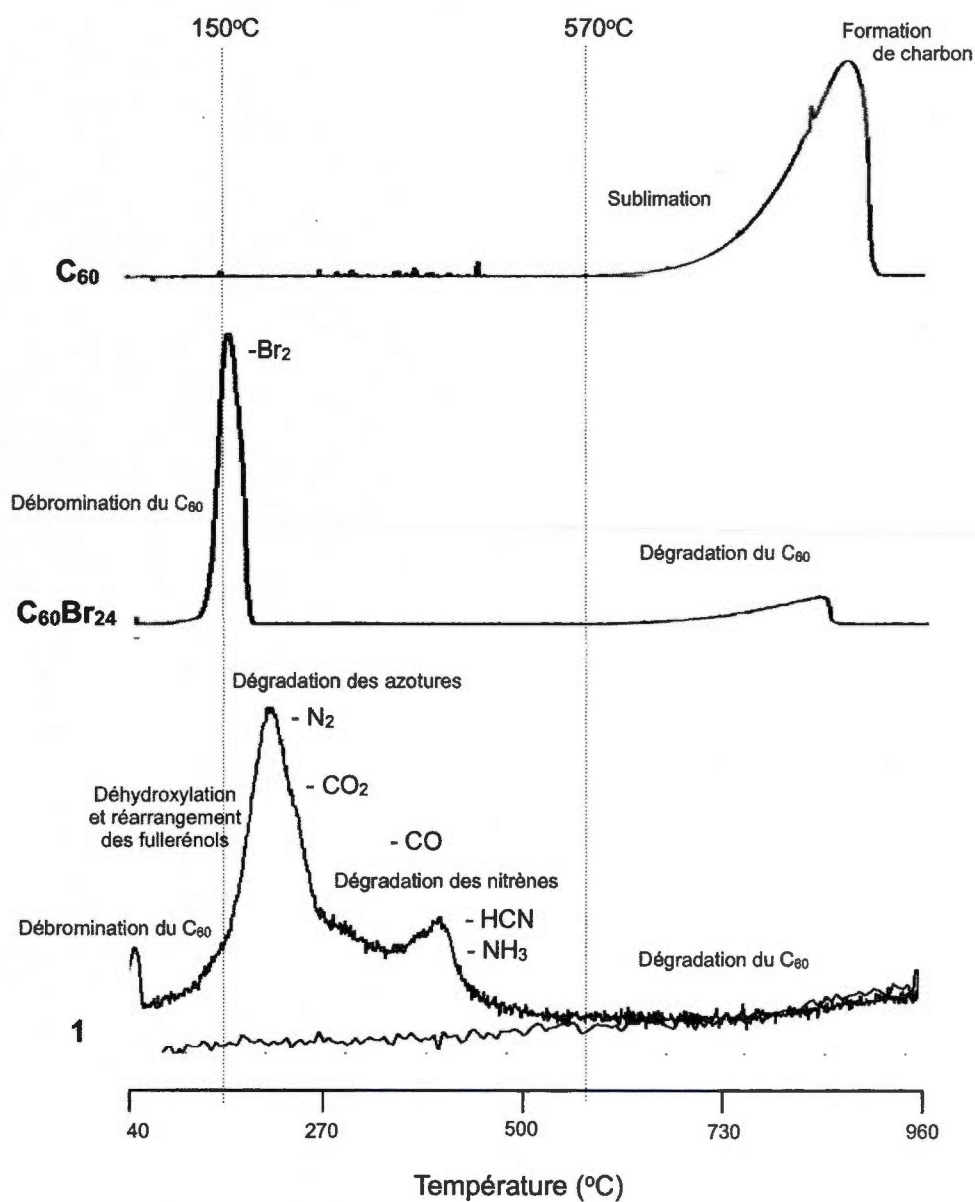


Figure 4.23: Thermogrammes du C_{60} , du $C_{60}Br_{24}$ et de 1.

Le spectre d'ATR de **2** (Fig.4.26) possède les mêmes elongations associées aux groupements CH_2 et aux liens O-H, C-O et C-N que **1**. Les elongations caractéristiques des groupements ammonium de **2** sont observées à $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, ainsi qu'à 1585 cm^{-1} (Silverstein et Webster, 1998). Une analyse détaillée du spectre d'ATR montre la présence des groupements carbonyle à 1718 cm^{-1} dans **2**. Cette impureté provient du réarrangement de type Pinnacol des hydroxy vicinaux du fullerène en milieu acide (Kokubo et al., 2008).

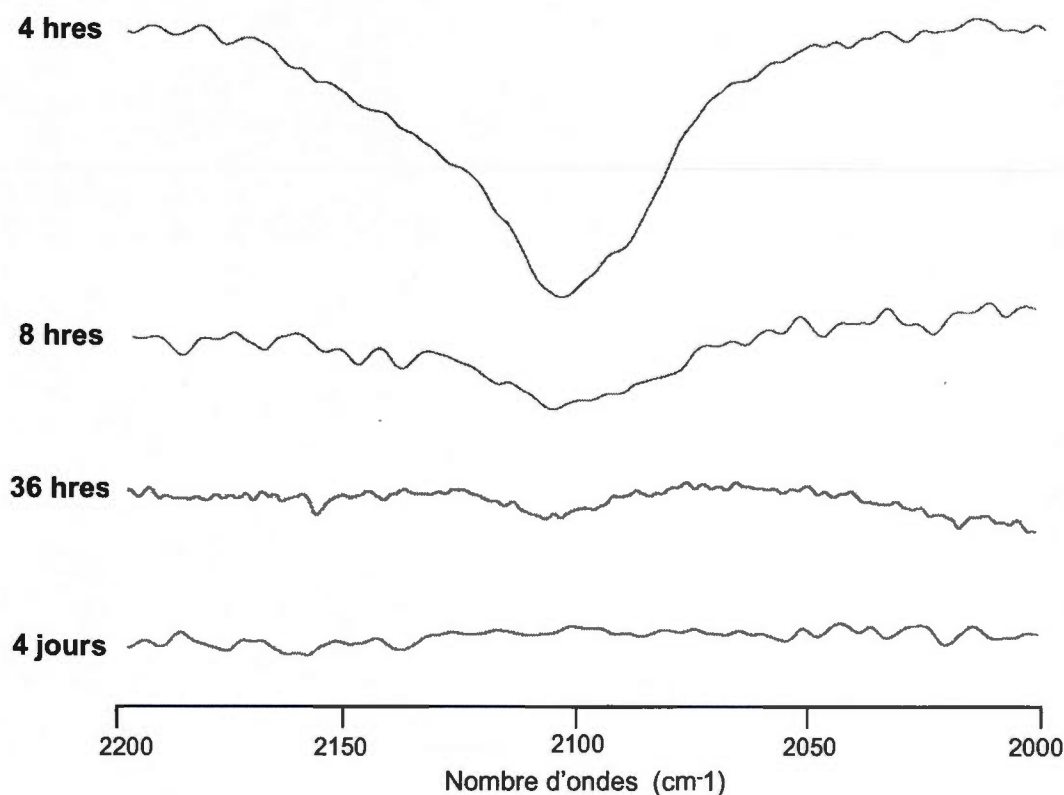


Figure 4.25: Conversion de l'elongation N_3 (2086 cm^{-1}) de **1** dans les conditions de Staudinger.

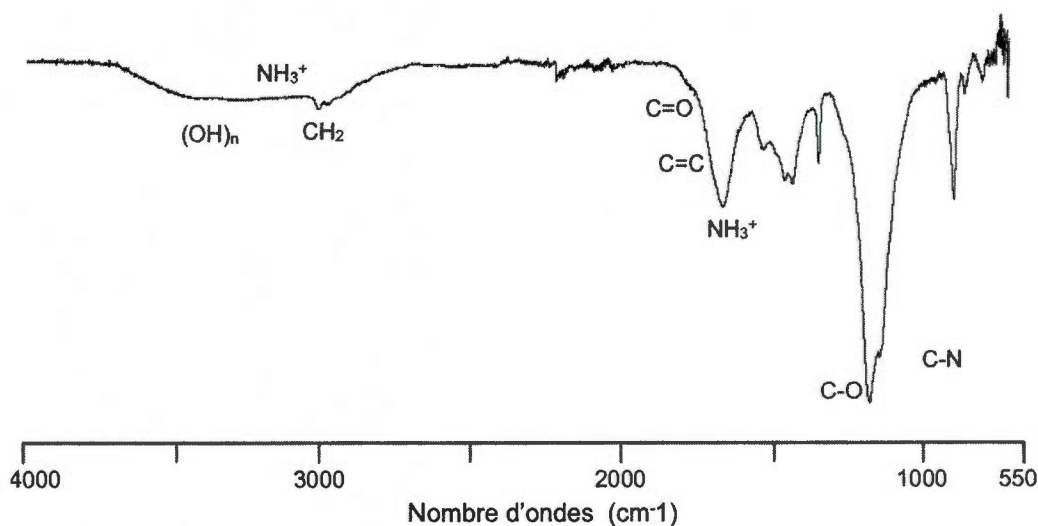


Figure 4.26: Spectre d'ATR de **2**.

Lors de la conversion de l'amine libre en chlorure d'ammonium, la présence de l'acide chlorhydrique peut catalyser le réarrangement de Pinnacol et expliquer la présence de l'élongation associée au carbonyle. Contrairement à **1**, aucune élongation caractéristique des liens C-Br n'est observée dans **2**. Les atomes résiduels de brome présents dans **1** ont été hydrolysés en présence d'eau pendant l'étape d'hydrolyse de l'iminophosphorane pour former une nouvelle unité hydroxy sur le fullerène. **2** est soluble dans l'eau dans les proportions de 25 mg/mL d'eau déionisée. Par contre, l'agréation de la nanoparticule est rapide et la formation d'une suspension colloïdale est observée en moins de cinq minutes à la température de la pièce. La microscopie à balayage électronique (*scanning electron microscopy*) de **2** (Fig.4.27) montre la formation d'agréats d'une taille de 1-5 μm sur plaquette de silice. Bien que **2** soit soluble dans l'eau, le phénomène d'agréation est important et rend impossible toute tentative de solubiliser le produit dans le D_2O à une concentration suffisante pour les analyses de RMN.

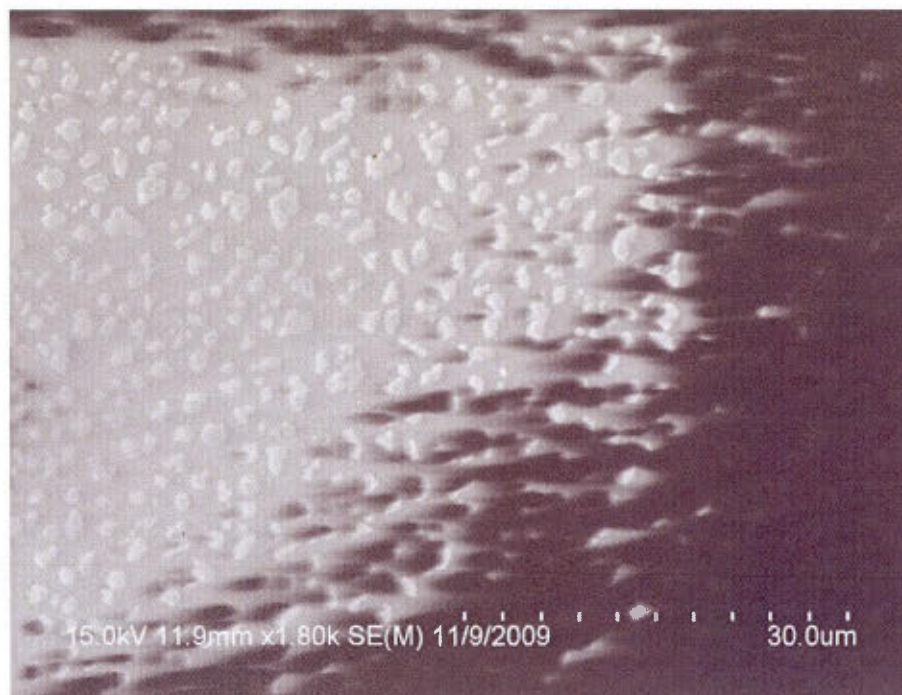


Figure 4.27: Image de spectroscopie SEM de **2** sur plaquette de silice (*gracieuseté du Prof Mohamed Siaj*).

4.3.3 Synthèse du fullerène polymannosylé ("sugar ball")

Le précurseur polyazoté (**1**) synthétisé à la section 4.3.1 est de pureté satisfaisante (93%) pour pouvoir effectuer le greffage d'unités du type 2-propargyle α -D-mannopyranoside (**4**) à l'aide de la cycloaddition 1,3-dipolaire de type Huisgen catalysée au cuivre (I). La formation du fulléroglyco "cluster" est lente, et le greffage de sept unités de sucres est effectué après deux jours de réaction à la température de la pièce avec un rendement de 83%. Le nombre de substituants est évalué à partir des thermogrammes (TGA) et de l'équation 4.1 ($M=472,35$ g/mol; $x=73\%$; $y=17\%$). La pureté du produit est évalué à 94% (TGA). Les impuretés principales sont l'eau et les solvants résiduels (6%).

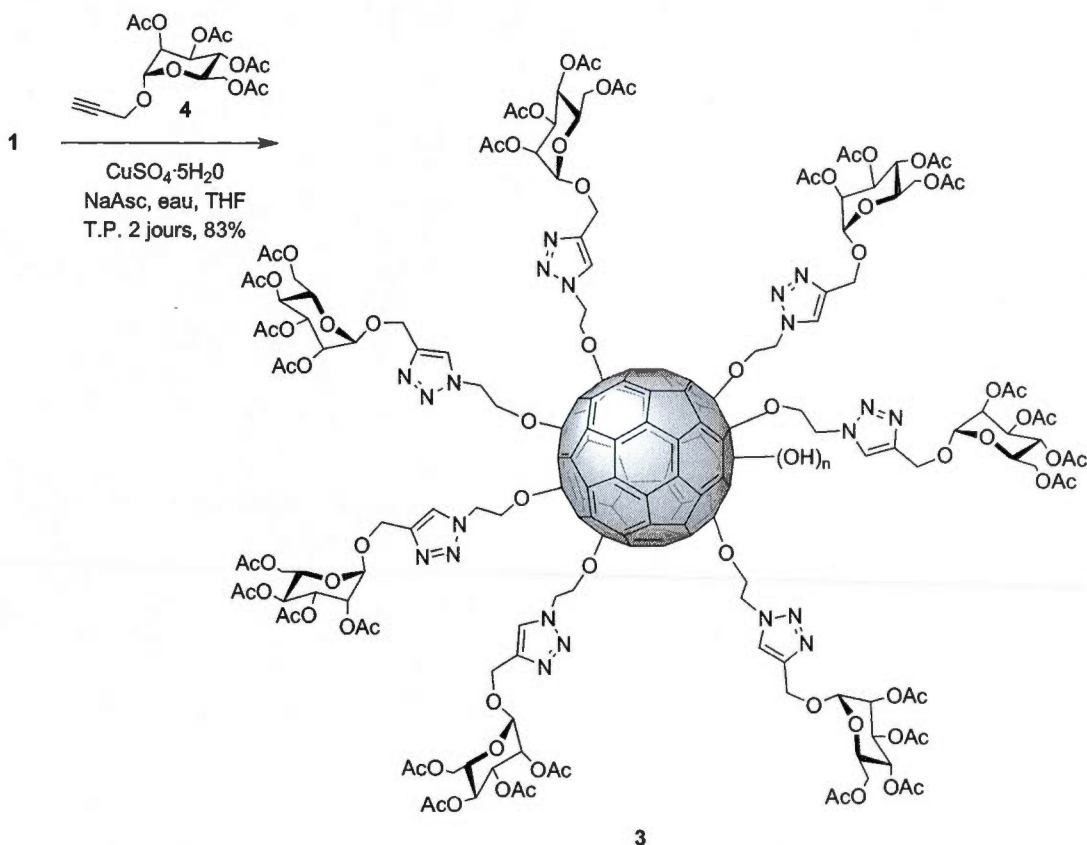


Figure 4.28: Synthèse de **3** à partir de **1** et **4** à l'aide la "Click chemistry".

En ATR, la disparition totale de la bande d'élongation des azotures à 2086 cm^{-1} est observée, suggérant la conversion quantitative de toutes les fonctions azoture en présence d'un excès d'équivalents de sucres propargylés par fonction azoture (1,75 éq./site). Le produit de départ de la réaction (**1**) possède dix substituants et le produit final (**3**), sept. La dégradation thermique ou basique de trois substituants $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ durant les conditions de couplage peut expliquer cette différence. Les groupements $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ en périphérie du C_{60} sont labiles et peuvent se décomposer en fonctions hydroxy résiduelles sur le fullerène.

Aussi, lors de l'évaluation du nombre de substituants dans **1**, la présence des hydroxy (OH)_n avait été négligée, surestimant possiblement la valeur des substituants à dix unités (Éq.4.2). Le greffage d'unités plus lourdes (M=479,35 g/mol) permettrait d'avoir une meilleure précision dans les calculs, par conséquent la structure de **1** pourrait être recalculée à sept substituants et quinze hydroxy (OH)_n n=15). Le nombre de substituants de **1** est variable et dépend des conditions expérimentales utilisées (Tableau 4.2). En considérant que 95% des sites azoture ont été substitués dans les conditions réactionnelles de la "*Click chemistry*" (Kolb et al., 2001), la masse brute de **3** récupérée lors de la réaction correspondrait à une formule moléculaire contenant environ de sept à dix substituants, en tenant compte de l'incertitude.

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C sont illustrés à la figure 4.29. L'important signal à 2,0 ppm attribué aux groupements acétyle confirme la présence des sucres acétylés en périphérie de **3**. De nombreux signaux élargis sont observés dans la région 5,2-3,7 ppm et sont attribués aux hydrogènes des carbohydrates. Ces signaux sont superposés aux signaux des groupements méthylène O-CH₂CH₂-N (3,9 et 3,5 ppm) déjà rapportés pour **1** (Fig.4.20). Encore, le signal élargi observé à 7,9 est attribué à l'hydrogène de l'unité triazole et confirme une fois le succès de la cycloaddition 1,3-dipolaire dans ces conditions. Finalement, le spectre de ¹³C montre l'apparition de sept nouveaux signaux dans **3**. Ces signaux sont attribués aux sucres et aux unités triazoles formées et n'étaient pas présents dans **1**.

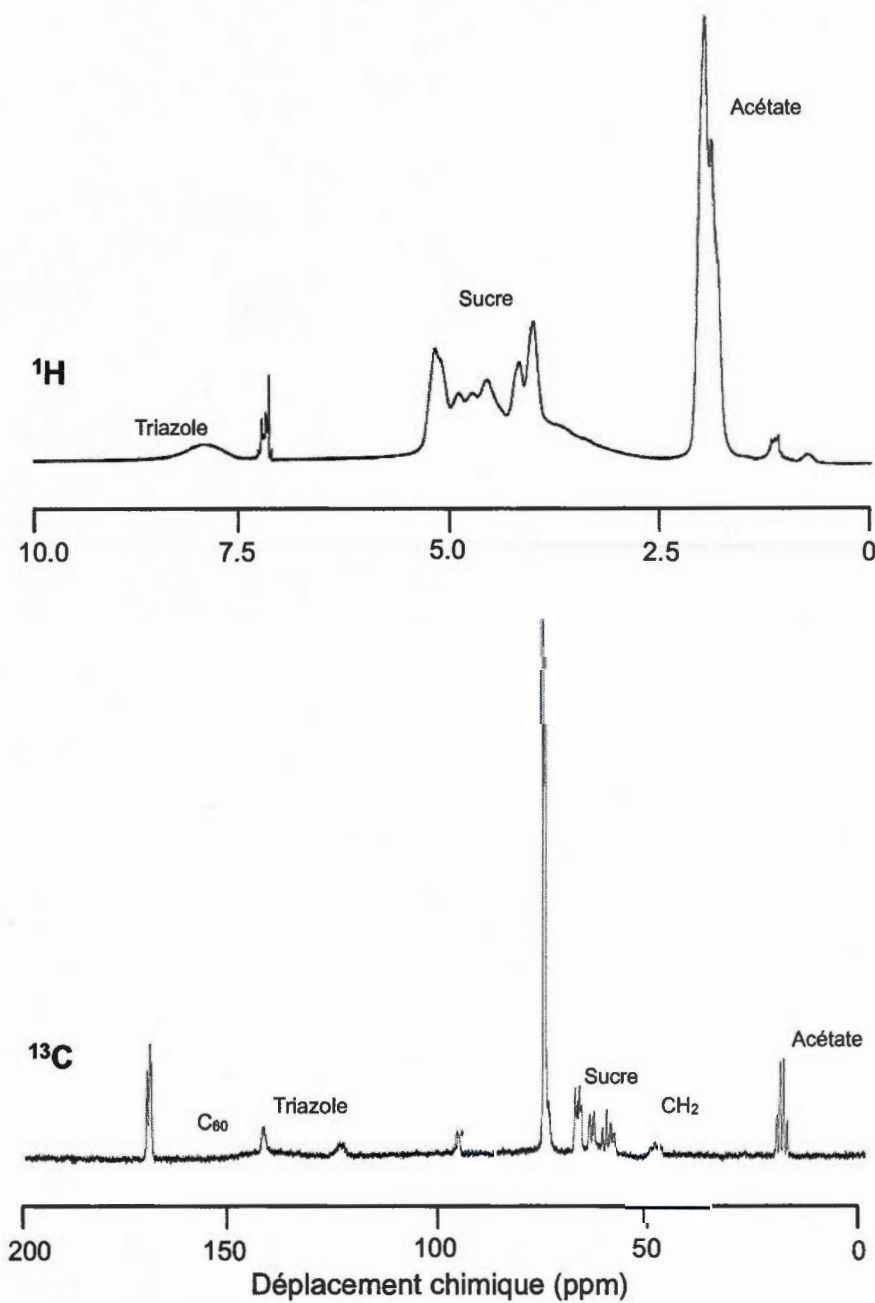


Figure 4.29: Spectres de RMN ¹H et ¹³C de **3** (300 MHz ¹H, 75 MHz ¹³C; CDCl₃, δ, ppm).

4.3.4 Essais de la réaction de Williamson sur le fullerénol

Le fullerénol est un nucléophile faible et encombré et l'alkylation des fonctions hydroxy en périphérie du fullerène est difficile et nécessite des conditions réactionnelles sévères et rigoureuses (Fig.4.30). Différentes conditions réactionnelles sont rapportées dans le tableau 4.4 et ont fait l'objet d'études intensives et systématiques afin d'optimiser les réactions de substitution et d'introduire des fonctions réactives en périphérie du C_{60} . L'éthérification du fullerénol dans les conditions de Williamson est possible seulement en présence de l'agent de transfert de phase TBAI (iodure du tétrabutylammonium). C'est aussi une source ionique d'iode qui est nécessaire à la catalyse de la réaction. Plusieurs essais ont démontré l'importance de ce catalyseur (TBAI). Lorsque les agents de transfert de phase TBACl (chlorure du tétrabutylammonium), TBABr (bromure du tétrabutylammonium) ou TBAOH (hydroxyde du tétrabutylammonium) sont utilisés dans les mêmes proportions, aucun produit de la réaction n'est observé (Tableau 4.4). De plus, l'importance d'une base forte est nécessaire dans le but de déprotoner les fullerénols ($pK_a=12,9$) (Hinokuma et Ata, 2001). Plusieurs essais sans succès avec les bases telles la DIPEA, la triéthylamine et la pyridine, même en présence de plusieurs centaines d'équivalents d'excès et à reflux, ont tous souligné la difficulté d'alkyler de façon quantitative les fonctions hydroxy sur la molécule. Seule la base DBU ($pK_a=16,6$) (Rodima et al., 2002) constitue une base assez forte pour promouvoir efficacement l'éthérification en présence de TBAI. Aussi, l'utilisation de plusieurs électrophiles a été étudiée comme le bromure de propargyle, le chlorure d'allyle et deux dérivés azotés à longueur de chaîne variable contenant le groupement partant tosylate, et ont tous montré très peu d'efficacité dans l'alkylation du fullerénol (Tableau 4.4).

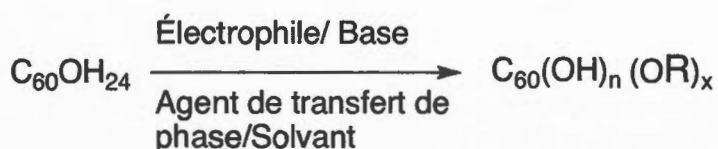


Figure 4.30: Schéma réactionnel de l'éthérification de Williamson.

Tableau 4.4: Différentes conditions réactionnelles étudiées pour la synthèse de **5** dans les conditions de Williamson

Électrophile (#éq/site)	R	Temps (jours)	Base (#éq./site)	ATP (#éq./site)	Solvent	T (°C)	Rendement (%)
		7	DBU (7)	TBAI (0,125)	neat	25	64
		1	DBU (2)	TBAI (0,125)	neat	25	30
		1	DBU (5)	TBAI (0,125)	neat	25	45
		1	DBU (7)	TBAI (0,250)	neat	25	38
		2	DBU (7)	TBAI (0,125)	neat	57	42
		2	DBU (7)	aucun	neat	57	5
		2	DBU (7)	TBAI (0,125)	50% DMF	57	15
		2	DIPEA (7)	TBAI (0,125)	neat	57	0
		7	DBU (7)	aucun	neat	25	5
		7	DBU (7)	TBACl (0,250)	neat	25	5
		7	DBU (7)	TBABr (0,250)	neat	25	5
		7	DBU (7)	TBAOH (0,250)	neat	25	5
		5	DBU (7)	TBAI (0,125)	neat	25	5
		5	DBU (7)	TBAI (0,125)	neat	25	25
		5	DBU (7)	TBAI (0,125)	neat	25	0
		5	DBU (7)	TBAI (0,125)	neat	25	0

Aussi, les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'utilisation du chlorure de propargyle à la fois comme électrophile et comme solvant (*neat*) (Fig.4.31). La cinétique de la réaction est suivie par TGA (Fig.4.32) et **5** contenant 22 substituants propargyles en périphérie du fullerène est obtenu avec un rendement de 64% après sept jours de réaction à la température de la pièce. Le nombre de substituants est calculé à partir des thermogrammes (Fig.4.32) et de l'équation 4.1 ($M=39$; C_3H_3). Pour cette molécule, le nombre d'unités hydroxy total (24) est connu et une soustraction tenant compte de la présence des 24 hydroxy est effectuée ($M=17$ g/mol). Les spectres d'ATR montrent les fréquences d'étirements caractéristiques des substituants propargyle et des hydroxy à 3400 cm^{-1} . Par contre, deux types de signaux sont observés pour les étirements des liens C-H alcyne (3240 et 3200 cm^{-1}) et C-C alcyne (2200 et 2000 cm^{-1}), suggérant la présence de deux types de substituants propargyle non équivalents sur le fullerène.

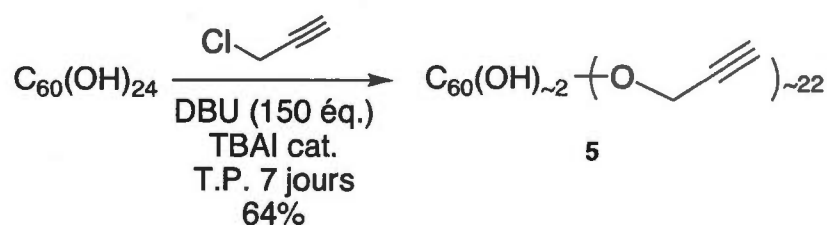


Figure 4.31: Conditions optimisées pour la synthèse de **5**.

Tableau 4.5: Rendement cumulatifs de la synthèse de **5**

Temps (jours)	Rendement (%)	# Substituants (TGA)
1	<15	-
3	45	8
5	56	16
7	64	22

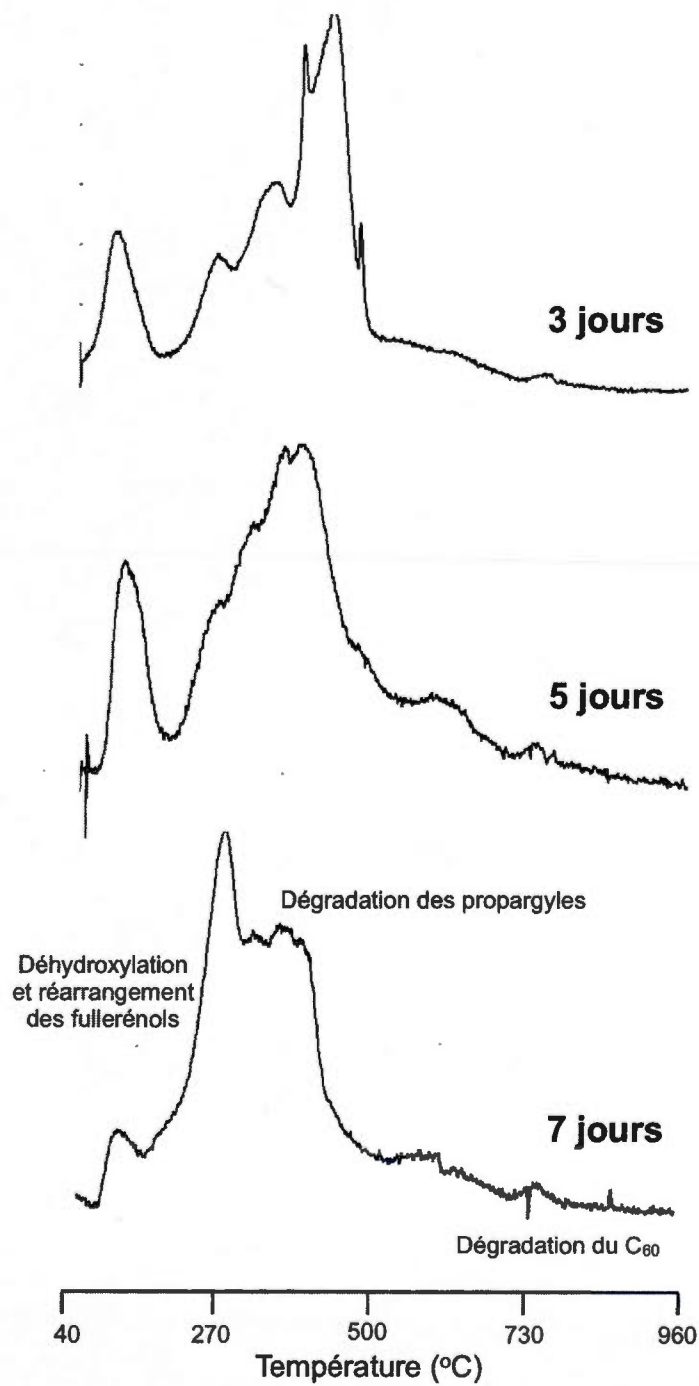


Figure 4.32: Cinétique de la synthèse de 5 suivie par analyse thermogravimétrique.

Une façon alternative de "prouver" le nombre de substituants en périphérie de **5** serait de le dériver à l'aide de la "*Click chemistry*" avec un sucre complémentaire contenant la fonction N_3 . Sachant que le greffage des fonctions à l'aide de la "*Click chemistry*" s'effectue avec un rendement de 95%, il serait possible à partir des rendements bruts de la réaction et des valeurs de perte de masse en TGA, d'établir le nombre de fonctions sur ce composé. **5** est soluble dans le chloroforme, par contre il forme des agrégats lorsqu'il est en solution pour des périodes prolongées. La difficulté de le solubiliser à des concentrations suffisantes pour les analyses de RMN et la formation d'un solide en suspension dans le chloroforme deutéré expliquent le pauvre signal obtenu en RMN 1H et l'impossibilité d'obtenir les spectres de RMN ^{13}C et de spectrométrie de masse de **5**. L'utilisation d'un spectromètre 600 MHz pour les analyses RMN en solution n'a pas permis d'augmenter la résolution spectrale pour ce produit. Aussi, les fullerénols et les dérivés des fullerénols en général sont reconnus pour former des radicaux stables, par conséquent ils sont paramagnétiques. Leur nombre de substituants peut être impair (Husebo et al., 2004) et leur comportement dans un champ magnétique est imprévisible.

Les analyses de ces composés paramagnétiques par RMN et spectrométrie de masse sont difficiles et nécessitent des conditions particulières. Ce phénomène peut expliquer les difficultés obtenues dans nos analyses et l'impossibilité de caractériser **5** davantage avec les méthodes conventionnelles. La spectroscopie de résonance paraélectronique (RPE) est une méthode d'analyse mieux adaptée pour les composés démontrant de la susceptibilité magnétique. Cette technique de spectroscopie sera approfondie davantage dans nos travaux futurs.

4.3.5 Solubilité des nanoparticules

Le fullerène C_{60} est reconnu pour son insolubilité dans l'eau et les solvants organiques. Les nanoparticules synthétisées au présent chapitre (**1**, **2**, **3** et **5**) sont des dérivés plus solubles du fullerène. La présence des groupements substitués en périphérie du C_{60} augmente la solubilité du produit. Par conséquent, les composés organiques **1**, **3** et **5** sont solubles dans les solvants organiques polaires (acétate d'éthyle, chloroforme ou méthanol) dans les proportions d'environ 20 mg/mL, tandis que le fullerénol ($C_{60}(OH)_{24}$) et **2** qui est un sel d'ammonium sont solubles dans l'eau dans les proportions de 50 et 10 mg/mL respectivement. Des tests préliminaires ont démontré que **3**, le "sugar ball", une fois déprotégé de ces fonctions acétyle pour libérer les hydroxy des carbohydrates, est très soluble dans l'eau dans les proportions de 25 mg/mL d'eau déionisée (non illustré). La figure 4.28 illustre les images en solution et en forme solide de quelques composés à base de fullerène utilisés ou synthétisés dans nos travaux. Une fois solubilisés, les produits forment rapidement des agrégats insolubles. Les nanoparticules s'auto-assemblent et forment des solides en suspension.

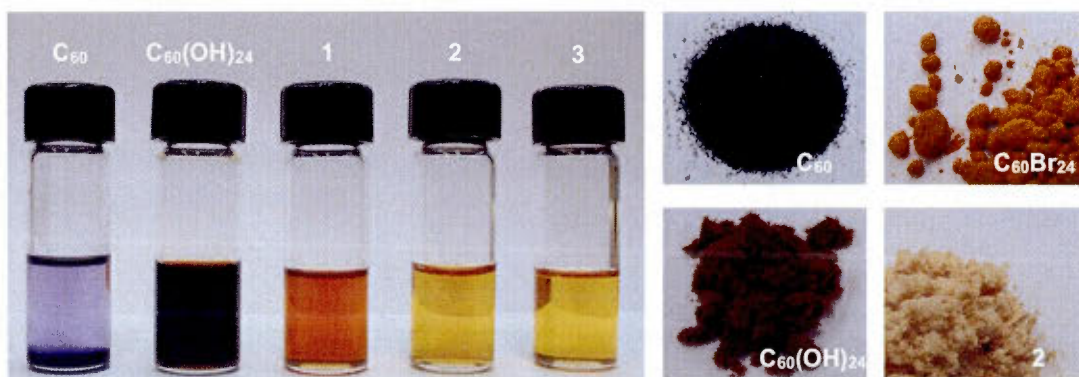


Figure 4.33: Images des composés en solution et sous la forme solide.

4.4 Conclusion

En résumé, nous avons développé une méthodologie pour introduire des substituants progargyle et azoture en périphérie du C_{60} en une étape à partir des précurseurs commerciaux $C_{60}Br_{24}$ et $C_{60}(OH)_{24}$. À partir du précurseur polyazidofullerène (1) synthétisé avec un rendement de 58%, nous avons synthétisé deux dérivés solubles du fullerène, soit un fullerène polycationique contenant environ dix fonctions ammonium (2) et un fulléroglyco "cluster" contenant environ sept unités D-mannose (3). Le nombre de substituants est évalué par TGA et plusieurs fonctions hydroxy au nombre indéterminé sont visibles en RMN et en ATR.

Aussi, la présence de brome résiduel est observée en ATR et en TGA pour le précurseur polyazidofullerène (1). La difficulté d'obtenir les analyses de spectrométrie de masse limite grandement l'évaluation exacte du nombre de substituants greffés en périphérie et la détermination de la masse exacte de nos produits. Plusieurs réactions secondaires de dégradation des substituants et de réarrangements de type Pinnacol sur le fullerène ont été observées par l'apparition de fonctions hydroxy et de carbonyle sur la molécule. Les nanoparticules synthétisées forment des agrégats rapidement en solution et ce phénomène d'agrégation limite certaines analyses de RMN ^{13}C et de spectrométrie de masse. Aussi, les fullerénols sont reconnus pour stabiliser les radicaux libres et sont paramagnétiques; la RPE serait la méthode indiquée pour poursuivre la caractérisation de nos produits. Dans le but, d'évaluer le nombre d'unités hydroxy sur nos composés, la DSC (*differential scanning calorimetry*) permettrait d'intégrer le nombre d'hydroxy à partir des valeurs théoriques d'enthalpie de déhydroxylation du C_{60} . Finalement, une méthode alternative pour évaluer le nombre d'hydroxy consisterait à dériver quantitativement ces fonctions et de les convertir en fonctions acétyle, ce qui permettrait de mesurer le rapport substituants/hydroxy acétylés avec l'intégration des signaux de RMN entre autre.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

À l'aide de la spectroscopie de RMN et d'IRTF, nous avons démontré l'affinité spécifique des fullerénols pour les membranes modèles de bactéries composées du phospholipide anionique DPPG. Pour imiter les membranes d'eucaryotes, des membranes modèles composées de DPPC/Cholestérol ont été utilisées et ont montré très peu d'interaction avec les NPs. Selon nos observations, les fullerénols sont solubles dans l'eau et interagissent spécifiquement avec les têtes polaires de la DPPG *via* des ponts-H. En présence de fullerénol, les membranes modèles de bactéries sont perturbées et la fluidité de la membrane est augmentée. L'effet est clairement visible en RMN ^{31}P statique et en MAS sur les membranes composées de DPPG/DPPC. L'interaction sélective avec le phospholipide DPPG est intéressante puisque ce phospholipide n'est pas présent dans les membranes d'eucaryotes. Nos études démontrent qu'il serait possible de mettre au point une nanoparticule à base de fullerénol démontrant un potentiel antibiotique élevé dont le pouvoir d'action repose sur le mécanisme de perturbation membranaire similaire au mécanisme des peptides antimicrobiens, tel le composé polycationique **2** synthétisé au Chapitre IV. En effet, **2** possède plusieurs fonctions ammonium en périphérie et pourrait avoir une affinité augmentée pour le phospholipide anionique DPPG. L'étude de l'interaction de ce composé avec les membranes modèles fera l'objet de travaux futurs.

En deuxième lieu, nous avons synthétisé un précurseur polyazidofullerène contenant environ dix fonctions azoture en périphérie du C_{60} (**1**) en une étape à partir du $\text{C}_{60}\text{Br}_{24}$ avec un rendement de 58% dans les conditions d'éthérification de Williamson. Ce composé est instable thermiquement, il a un ratio $\text{C/N} \approx 3$, par conséquent il se classe dans la famille des composés énergétiques et certaines précautions sont nécessaires dans la manipulation de ce produit en laboratoire. À l'aide de la réduction de Staudinger, le composé polycationique **2**, de la formule générale $\text{C}_{60}(\text{OH})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_{10}$, fut synthétisé avec un rendement de 79% après la formation du sel hydrochlorure. Aussi, à l'aide de la "*Click chemistry*", le composé **3** contenant environ sept unités de sucres en périphérie du C_{60} a été

synthétisé avec un rendement de 83% à partir du précurseur polyazidofullerène (1). Le nombre d'unités a été évalué par TGA et le nombre d'hydroxy sur le fullerène reste à déterminer dans nos travaux futurs. Les nanoparticules synthétisées sont fortement solubles dans l'eau (25mg/ml) ou les solvants organiques (10mg/ml) selon le cas et forment rapidement des agrégats en solution, limitant ainsi certaines analyses de RMN en solution. Les dérivés du fullerénols sont reconnus pour stabiliser les radicaux libres et par conséquent, être paramagnétiques. Ils ont une susceptibilité magnétique et leur comportement imprévisible dans un champ magnétique a empêché toute analyse de spectrométrie de masse dans les conditions usuelles. Par contre, l'analyse de RMN de l'état solide des membranes de phospholipides n'a pas semblé être affectée par la présence de fullerénol paramagnétique dans les membranes modèles à une proportion de 5 mol%. Les membranes modèles étudiées ne sont pas paramagnétiques et l'étude des noyaux du phosphore et du deutérium n'a pas été perturbée par la présence d'une petite quantité de NPs paramagnétiques dans le mélange (0,75mg de fullerénol par échantillon RMN).

En résumé, à l'aide de la spectroscopie de RMN-ÉS et d'IRTF, nous avons démontré l'effet spécifique des fullerénols sur les membranes modèle de bactéries contenant le phospholipide anionique DPPG. Le mécanisme d'action est similaire à celui des peptides antimicrobiens. Aussi, en deuxième partie, nous avons synthétisé des molécules à base de fullerène contenant des fonctions ammonium ou des sucres dérivés du D-mannose. Nos travaux combinés suggèrent une piste intéressante dans le développement de nanoparticules à base de fullerène ayant un potentiel antimicrobien et une spécificité pour les membranes bactériennes de type *E. coli*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Exp.1 Généralités

Les fullerènes C_{60} et $C_{60}(OH)_{24}$ sont de pureté supérieure à 99% et proviennent de chez M.E.R. Corp. (Tucson, AZ). L'eau utilisée est de grade Barnstead NANOPure. **4** a été synthétisé et fourni par Yoann M. Chabre. L'image de microscopie SEM est une gracieuseté du Prof Mohamed Siaj.

Analyses physico-chimiques

Les points de décomposition sont mesurés sur un appareil de type Fisher Jones et ne sont pas corrigés. Les spectres d'ATR ont été obtenus sur un appareil Nicolet 6700 modèle *smart* iTR de Thermo Scientific. Les analyses de TGA ont été prises sur un appareil TD/DTA 6200 modèle Excstar 6000 de Seiko Instruments avec un gradient de 5 °C/ minute sous atmosphère d'azote.

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés soit sur un appareil Varian-Gemini 2000 à des fréquences de 300 MHz pour le proton (1H) et de 75 MHz pour le carbone (^{13}C) ou sur un spectromètre Varian Inova à des fréquences de 600 MHz pour le proton (1H) et 150 MHz pour le carbone (^{13}C). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et le chloroforme deutéré est utilisé comme référence interne étalonnée à $\delta=7,27$ ppm pour le proton et $\delta=77,0$ ppm pour le carbone. La notation suivante est indiquée pour décrire les spectres: s (singulet), sl (singulet large), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet), m (massif ou multiplet) et ml (multiplet large).

Exp.2 Protocoles généraux

Protocole A: bromination du C₆₀ (Djordjevic et al., 1998)

Le fullerène (300 mg) est dissout dans le brome liquide (2 mL) et une quantité catalytique de FeBr₃ (environ 10 mg) est ajoutée. Le mélange est agité à l'aide d'une barreau magnétique pendant 40 minutes sous azote à la température de la pièce. Ensuite le brome est évaporé sous vide à une température inférieure à 30 °C. Un solide orangé insoluble est recueilli et est lavé plusieurs fois (5 X 15 mL) par précipitation à l'aide d'une solution éthanol-eau (1:2). Ensuite, le solide est séché sous vide pendant 24 heures à l'abri de la lumière.

Protocole B: préparation d'un azoture d'alkyle (Lu et Bittman, 2005)

Un mélange de 2-bromoéthanol (0,05 moles, 6,25 g), d'azoture de sodium (0,075 mole, 4,9 g) et d'une quantité catalytique du bromure de tétrabutylammonium (0,05 g) est agité et chauffé à 110°C pendant quinze heures sous azote. Ensuite, le mélange est refroidi et les sels formés lors de la réaction sont filtrés sous vide à l'aide d'un Büchner et rincés plusieurs fois à l'aide de l'éther éthylique anhydre (2 X 50 mL). La phase organique est lavée à l'eau (2 X 25 mL), puis séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée sous vide. L'huile claire recueillie est distillée sous vide à une température inférieure à 80°C.

Protocole C: étherification de Williamson du C₆₀Br₂₄

5 mL de 2-azidoalcool (alcool propargylique ou 2-azidoéthanol) sont refroidis à -5°C dans un bain de glace sous azote. La base, *n*-BuLi 2,5 M dans l'hexane (2 mL, 5 mmoles) ou le NaH en suspension dans l'hexane (5 mmoles, 120 mg), est ajouté par petite portion à l'aide d'une seringue ou d'une canule sur le 2-azidoéthanol sur une période de 30 minutes avec agitation. Un dégagement gazeux

d'hydrogène est observé. La solution est agitée pendant deux heures supplémentaires à la température de la pièce et l'hexane est évaporé à l'aide d'un courant d'azote. Ensuite, le bromofullerène (0,05 mmoles, 134 mg) est ajouté en une portion. Le mélange devient rouge foncé et la solution est agitée à la température de la pièce à l'abri de la lumière pour une semaine supplémentaire. Après, le mélange est neutralisé avec 5 mL d'eau et le mélange est dissout avec de l'acétate d'éthyle (3 X 5 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée, puis évaporée sous vide. Un solide très soluble de couleur orangé est obtenu, puis lavé trois fois par précipitation dans l'acétate d'éthyle et l'hexane. Le produit est séché sous vide pendant trois jours.

Protocole D: réduction de Staudinger

La triphénylphosphine (0,125 mmoles, 33 mg) est dissoute dans le THF (1 mL) et le mélange est agité sous azote pendant dix minutes. Ensuite, **1** (~6,3 μ moles, 10 mg) est ajouté en une portion. La couleur de la solution devient jaune et la formation d'un solide insoluble est observée. La solution est agitée à la température de la pièce sous azote. Après quatre jours, la disparition complète du signal en ATR associé à la bande azoture (2086 cm^{-1}) est observée et le mélange est neutralisé avec 1 mL d'eau nanopure. Le mélange est agité pour une période supplémentaire de 24 heures. Ensuite, l'amine insoluble de couleur jaune est récupérée par filtration ou centrifugation et purifiée trois fois par précipitation à l'aide d'un mélange THF-éther (1:5). L'amine récupérée est séchée sous vide pendant 24 heures et lyophilisée trois jours. Ensuite, le solide jaune (7,2 mg) est suspendu dans le méthanol (1 mL) et de l'acide chlorhydrique gazeux est introduit jusqu'à ce que le pH de la solution soit acide. Le sel d'ammonium est alors précipité à l'éther éthylique anhydre (10 mL) et le solide blanc est récupéré par filtration ou centrifugation et rincé à l'éther diéthylique anhydre (3 X 5 mL). Le solide récupéré sous la forme d'un sel de chlorure d'ammonium (**2**) est séché sous vide pendant 24 heures et lyophilisé trois jours avant les analyses.

Protocole E: couplage par la "Click chemistry"

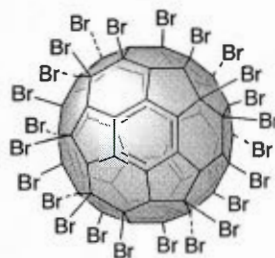
Le mannopyranoside (**4**, 75 mg, 0,2 mmoles) est dissout dans le THF (1,2 mL) et 1,2 mL d'eau nanopure est ajouté. Ensuite, le sulfate de cuivre pentahydraté (19 mg, 0,7 éq./site) et l'ascorbate de sodium (15 mg, 0,7 éq./site) sont ajoutés. Le mélange est agité sous azote pendant dix minutes, puis le polyazidofullerène (**1**, 18 mg, ~11,3 μ moles) est ajouté en une portion. Le mélange est chauffé à 55°C pour une période de quatre heures, puis la solution est agitée à la température de la pièce pour 48 heures. Ensuite, le mélange réactionnel est plongé dans une solution saturée de chlorure d'ammonium (5 mL) et la phase organique est extraite au dichlorométhane (3 X 5 mL). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un système d'éluants méthanol/chloroforme (5:95) pour obtenir le produit désiré.

Protocole F: éthérification de Williamson du C₆₀(OH)₂₄

Le fullerénol (11 mg, 10 μ moles) est mis en suspension dans le solvant réactionnel (2 mL) et l'agent de transfert de base est ajouté. La suspension est agitée sous azote pendant dix minutes. Le mélange est ensuite refroidi à -5°C dans un bain de glace, la base est ajoutée et la solution est agitée pendant 30 minutes à la température de la pièce. Ensuite, l'électrophile est ajouté et la réaction est agitée à la température de la pièce pour une période de 24 heures à cinq jours dans le noir. Ensuite, le mélange réactionnel est neutralisé avec de l'eau (5 mL) et la phase organique est extraite au chloroforme (20 mL), lavée plusieurs fois à l'eau (3 X 10 mL), puis séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit récupéré est séché sous vide pendant 24 heures.

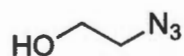
Exp.3 Caractérisation des composés

Tétracosabromofullerène: $C_{60}Br_{24}$



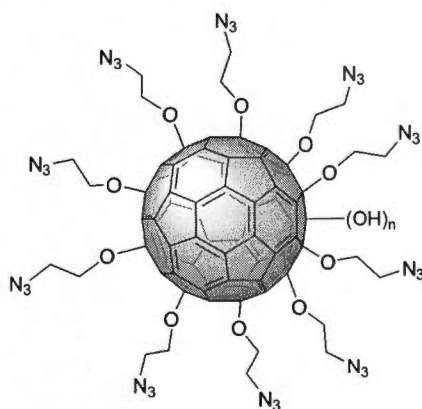
Protocole A: À partir du C_{60} (300 mg, 0,47 mmoles) est obtenu le $C_{60}Br_{24}(Br_2)_{0,5}$ (1104 mg, 99%) sous la forme d'une solide orangé insoluble. Mp: 300°C (*décomp.*); ATR: 1250, 1180, 1140, 1080, 1050, 960, 930, 850, 780, 760, 730, 600, 560, 550 cm^{-1} ; TGA: un signal à 165°C, perte de masse: 73,1%. Les données spectrales et physiques sont en tout point identiques avec les données rapportées dans la littérature (Djordjevic et al., 1998).

2-Azidoéthanol: $HOCH_2CH_2N_3$



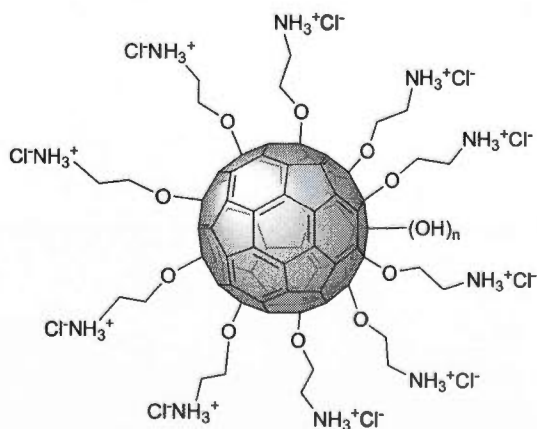
Protocole B: À partir du 2-bromoéthanol (6,25 g, 0,05 moles) est obtenu le 2-azidoéthanol (3,9 g, 90%). Les données spectrales et physiques sont en tout point identiques avec les données rapportées dans la littérature (Lu et Bittman, 2005). **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 3,74 (t, 2H), 3,41 (t, 2H), 2,40 (s, 1H); **RMN ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 61,5, 53,6.

Composé 1: déca (2-azidoéthoxy) fullerène



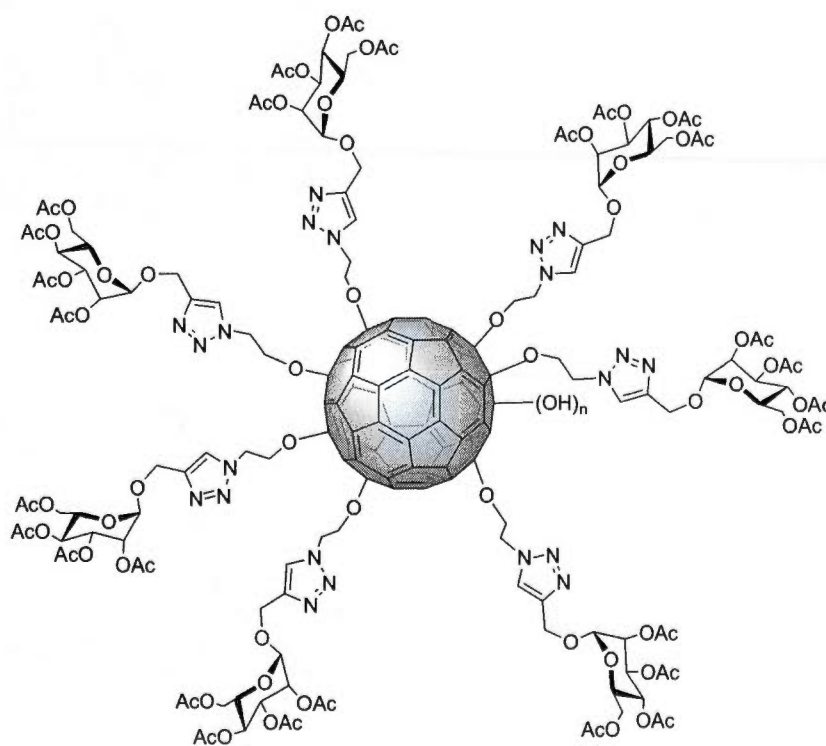
Protocole C: À partir du $C_{60}Br_{24}(Br_2)_{0,5}$ (134 mg, 0,05 mmoles) est obtenu **1** sous la forme d'un solide orangé (46 mg, 58%; pureté: 97%; $C_{80}H_{40}N_{30}O_{10}$). Mp: 150-300°C (décomp.); ATR: 3430 (OH), 2928 ($\nu_{asy}CH_2$), 2877 ($\nu_{sym}CH_2$), 2086 (N_3), 1652 (C=C), 1456, 1438, 1346, 1284 ($\nu_{asy}C-O$), 1168, 1078 ($\nu_{sym}C-O$), 1012 (C-N), 728, 646 cm^{-1} ; TGA: perte de masse entre 40-100°C: 5%, 100-150°C: 2%, 150-570°C: 50%, en haut de 570°C + suie: 43%; **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 4,4 (m), 3,9 (m, 2H), 3,5 (m, 2H); **RMN ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 150, 66,7, 51,0.

Composé 2: hydrochlorure du déca (2-aminoéthoxy) fullerène



Protocole D: À partir de **1** (10 mg, ~6,3 µmoles) est obtenu **2** sous la forme d'un solide blanc (8,3 mg, 79%). Mp: 300°C (*décomp.*); ATR: 3430 (OH), 3000-2800 (NH_3^+), 2963 ($\nu_{\text{asy}}\text{CH}_2$), 2925 ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$), 1720 (C=O), 1652 (C=C), 1585 (NH_3^+), 1456, 1438, 1376, 1284 ($\nu_{\text{asy}}\text{C-O}$), 1188, 1084 ($\nu_{\text{sym}}\text{C-O}$), 1055 (C-N), 765, 696 cm^{-1} .

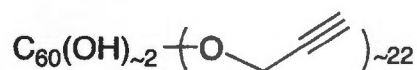
Composé 3: "sugar ball"



Protocole E: À partir de **1** (18 mg, ~11,3 µmoles) et de **4** (75 mg, 0,2 mmoles) est obtenu **3** sous la forme d'un solide orangé (38 mg, 83%; pureté 94%; $\text{C}_{186}\text{H}_{182}\text{N}_{21}\text{O}_{77}$), Mp: 150-300°C (*décomp.*); ATR: 3430 (OH), 2958 ($\nu_{\text{asy}}\text{CH}_3$), 2922 ($\nu_{\text{asy}}\text{CH}_2$), 2872 ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_3$), 2851 ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$), 1742 (C=O), 1642 (C=C), 1456, 1435, 1368, 1220 ($\nu_{\text{asy}}\text{C-O}$), 1133, 1078 ($\nu_{\text{sym}}\text{C-O}$), 1045 (C-N), 596 cm^{-1} ; TGA: perte de masse entre 150-570°C: 77%, en haut de 570°C + suie: 17%; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7,9 (m), 5,2 (m), 4,9 (m), 4,8 (m), 4,6 (m), 4,2 (m), 4,1 (m), 3,7 (m),

4,2 (m), 2,0 (s) 1,9 (s); **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 169,8 (m), 143,1, 125,1, 97,2, 69,0, 65,2, 62,0, 50,1, 21,0.

Composé 5:



Protocole F: À partir du $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ (10 mg, $\sim 8,9 \mu\text{moles}$) est obtenu **5** sous la forme d'un solide brun (11,1 mg, 64%; pureté 94%), Mp: 150-300°C (*décomp.*); ATR: 3430 (OH), 3240-3199 (deux signaux C-H alcyne), 2924 ($\nu_{\text{asy}}\text{CH}_2$), 2854 ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$), 2220-2200 (deux signaux C-C alcyne), 1717 (C=O), 1620-1617 (deux signaux C=C ou COO^-), 1521, 1442, 1332 (C-H), 1259 ($\nu_{\text{asy}}\text{C-O}$), 1077 ($\nu_{\text{sym}}\text{C-O}$), 1011, 798, 659 cm^{-1} ; TGA: perte de masse entre 150-570°C: 60%, en haut de 570°C + suie: 34%.

BIBLIOGRAPHIE

- Alekseyev NI, Dyuzhev GA (2003) Fullerene formation in an arc discharge. *Carbon* 41:1343-1348
- Aoshima H, Kokubo K, Shirakawa S, Ito M, Yamana S, Oshima T (2009) Antimicrobial activity of fullerenes and their hydroxylated derivatives. *Biocontrol. Sci.* 14:69-72
- Bakry R, Vallant RM, Najam-ul-Haq M, Rainer M, Szabo Z, Huck CW, Bonn GK (2007) Medicinal applications of fullerenes. *Int. J. Nanomedicine* 2:639-649
- Benveniste R et Davies J (1973) Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 42:471-506
- Bensikaddour H, Snoussi K, Lins L, Van Bambeke F, Tulkens PM, Brasseur R, Goormaghtigh E, Mingeot-Leclercq MP (2008) Interactions of ciprofloxacin with DPPC and DPPG: fluorescence anisotropy, ATR-FTIR and ^{31}P NMR spectroscopies and conformational analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:2535-2543
- Bingel C (1993) Cyclopropanierung von Fullerene. *Chem. Ber.* 126:1957
- Bloom M, Mouritsen OG (1995) The evolution of membranes. In: Lipowsky R and Sackmann E (eds.) *Handbook of Biological Physics*. Vol.1: Structure and Dynamics of Membranes. Elsevier, Amsterdam, pp.65-95
- Bogdanovic G, Kojic V, Dordevic A, Canadanovic-Brunet J, Vojinovic-Miloradov M, Baltic VV (2004) Modulating activity of fullerol $\text{C}_{60}(\text{OH})_{22}$ on doxorubicin-induced cytotoxicity. *Toxicol. in Vitro* 18:629-637
- Bordwell FG, Sokol PE, Spainhou JD (1960) Effect of the leaving group on the rates of $\text{S}_{\text{N}}2$ and $\text{S}_{\text{N}}2'$ reactions in allylic systems. *J. Am. Chem. Soc.* 82: 2881-2888
- Bosi S, Da Ros T, Spalluto G, Prato M (2003) Fullerenes derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur. J. Med. Chem.* 38: 913-923
- Bräse S, Gil C, Knepper K, Zimmermann V (2005) Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:5188-5240
- Braun M, Hirsch A (2000) Fullerenes derivatives in bilayer membranes: an overview. *Carbon* 38:1565-1572
- Burnett LJ, Muller BH (1971) Deuteron quadrupole coupling constants in three solid deuterated paraffin hydrocarbons: C_2D_6 , C_4D_{10} , C_6D_{14} . *J. Chem. Phys.* 55:5829-5831
- Camps X, Hirsch A (1997) Efficient cyclopropanation of C_{60} starting from malonates. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1:1595-1596

- Carlmark A, Hawker C, Hult A, Malkoch M (2009) New methodologies in the construction of dendritic materials. *Chem. Soc. Rev.* 38:352-362
- Casal HL, Mantsch HH (1984) Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 779:381-401
- Chabre YM, Roy R (2010) Design and creativity in synthesis of multivalent neoglycoconjugates. In Derek Horton, editor: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 63, Burlington: Academic Press, pp. 165-393
- Chawla P, Chawla V, Maheshwari R, Saraf SA, Saraf SK (2010) Fullerene: from carbon to nanomedicine. *Mini Rev. Med. Chem.* 10:662-677
- Chen C, Xing G, Wang J, Zhao Y, Li B, Tang J, Jia G, Wang T, Sun J, Xing L, Yuan H, Gao Y, Meng H, Chen Z, Zhao F, Chai Z, Fang X (2005) Multihydroxylated [Gd@C82(OH)22]n Nanoparticles: Antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity. *Nano Lett.* 5:2050-2057
- Chiang LY, Wang LY, Swirczewski JW, Soled S, Cameron S (1994) Efficient synthesis of polyhydroxylated fullerene derivatives via hydrolysis of polycyclosulfated precursors. *J. Org. Chem.* 59:3960-3968
- Davis JH (1983) The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ^2H -NMR. *Biochim Biophys Acta* 737:117-171
- Dobrovolskaia MA, Clogston JD, Neun BW, Hall BJ, Patri AK, McNeil SE (2008) Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Lett.* 8:2180-2187
- Denisenko NI, Troyanov SI, Popov AA, Kuvychko IV, Zemva B, Kemnitz E, Stauss SH, Boltalina OV (2004) $T_h\text{-C}_{60}\text{F}_{24}$. *J. Am. Chem. Soc.* 126:618-1619
- Diederich F (1997) Covalent fullerene chemistry. *Pure & Appl. Chem.* 69:395-400
- Djordjevic A, Vojinovic-Miloradov M, Petranovic N, Devecerski A (1998) Catalytic preparation and characterization of $\text{C}_{60}\text{Br}_{24}$. *Fullerene Sci. Techn.* 6:689-694
- Dondoni A, Marra A (2002) Synthesis of [60] fulleropyrrolidine glycoconjugates using 1,3-dipolar cycloaddition with C-glycosyl azomethine ylides. *Tetrahedron Lett.* 43:1649-1652
- D'Rosario R, Wee C, Wallace E, Sansom M (2009) The interaction of C_{60} and its derivatives with a lipid bilayer via molecular dynamics simulations. *Nanotechnol* 20:115102 (7pp)
- Dubrovsky R, Bezmelnitsyn V, Eletsii A (2004) Plasma fullerene production from powdered carbon black. *Carbon* 42:1063-1066
- Durka M, Buffet K, Leh J, Holler M, Nierengarten JF (2010) The functional valency of dodecamannosylated fullerenes with *Escherichia coli* FimH- toward novel bacterial antiadhesives. *Chem. Comm.* 47:1321-1323

- Endress E, Bayerl S, Prechtel K, Maier C, Merkel R, Bayerl T (2002) The effect of cholesterol, lanosterol, and ergosterol on lecithin bilayer mechanical properties at molecular and microscopic dimensions: a solid-state NMR and micropipet study. *Langmuir* 18:3293-3299
- Epand RM, Vogel HJ (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:11-28
- Evans JNS (1995) in: *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, New York, 444p
- Forrest RD (1982) Early history of wound treatment. *J. R. Soc. Med.* 75:198-205
- Gayathri SS, Kamruddin M, Tyagi AK, Patnaik A (2003) Establishing a kinetic control regime for the decomposition of brominated fullerene derivatives: $C_{60}Br_{24}$ and $C_{60}Br_6$. *Chem. Phys. Lett.* 374:33-40
- Goldfine H (1984) Bacterial membranes and lipid packing theory. *J. Lipid Res.* 25:1501-1507
- Gololobov YG, Zhmurov IN, Kasukhin IF (1981) Sixty years of Staudinger reaction. *Tetrahedron* 37:437-472
- Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M (2005) Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 365:579-87
- Goswami TH, Singh R, Alam S, Mathur GN (2004) Thermal analysis: a unique method to estimate the number of substituents in fullerene derivatives. *Thermochim. Acta* 419:97-204
- Govindaraj A (1993) Investigations of the fullerene hydride $C_{60}H_{36}$. *Curr. Sci.* 65: 868-869
- Guo W, Hamilton J (1995) A multinuclear solid-state NMR study of phospholipid-cholesterol interactions. Dipalmitoylphosphatidylcholine-cholesterol binary system. *Biochemistry* 34:14174-14184
- Hackerborn RA, Herzfeld J, Griffin RG (1978) High resolution ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of unsonicated model membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 100:1296-1298
- Haeberlen U (1976) High Resolution NMR in solids: supplement 1. In: Waugh JS ed. *Advances in Magnetic Resonance*. Academic Press. NY, USA.
- Hajduk PJ, Warren RJD, Spring G, Spring DR (2011) Drug discovery: A question of library design. *Nature* 470:42-43

- Hawkey PM (1998) The origins and molecular basis of antibiotics resistance. *Br. Med. J.* 317:657-660
- Hill M (2008) ANAT3231 Lecture 03- Compartments and Membranes. In: *UNSW Cell Biology*. <http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/science/lecture0803.htm>
- Hinokuma K, Ata M (2001) Fullerene proton conductors. *Chem. Phys. Lett.* 341:442-446
- Hirsch A, Lamparth I, Groesser T, Karfunkel HR (1994) Regiochemistry of multiple additions to the fullerene core: synthesis of *Th*-symmetric hexakis adduct of C₆₀ with bis(ethoxycarbonyl)methylene. *J. Am. Chem. Soc.* 116:9385-9386
- Hirsch A (2010) The era of carbon allotropes. *Nature Mat.* 9:868-871
- Hong M, Su Y (2011) Structure and dynamics of cationic membrane peptides and proteins: insights from solid-state NMR. *Protein Sci.* 20:641-655
- Huisgen R (1963) 1,3-dipolar cycloaddition. Past and future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2:565-598
- Husebo LO, Sithamaran B, Furukawa K, Kato T, Wilson LJ (2004) Fullerenols revisited as stable radical anions. *J. Am. Chem. Soc.* 126:12055-12064
- Isobe H, Mashima H, Yorimitsu H, Nakamura E (2003) Synthesis of fullerene glycoconjugates through sulfide connection in aqueous media. *Org. Lett.* 5:4461-4463
- Isobe H, Cho K, Solin N, Wertz DB, Seeberger PH, Nakamura E (2007) Synthesis of fullerene glycoconjugates via a copper-catalyzed Huisgen cycloaddition reaction. *Org. Lett.* 9:4611-4614
- Kato H, Yashiro A, Mizuno A, Nishida Y, Kobayashi K, Shinohara H (2001) Synthesis and biological evaluations of α -D-mannosyl [60] fullerenols. *Bioorg Med Chem Lett* 11:2935-2939
- Kato H, Böttcher C, Hirsch A (2007) Sugar Balls: synthesis and supramolecular assembly of [60] fullerene glycoconjugates. *Eur. J. Org. Chem.* 16:2659-2666
- Kilfoil ML, Morrow MR (1998) Slow motions in bilayers containing anionic phospholipid. *Physica A* 261:82-94
- Killian JA, Borle F, Kruijff B, Seelig J (1986) Comparative ²H- and ³¹P-NMR study on the properties of palmitoyllysophosphatidylcholine in bilayers with gramicidin, cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 854:133-142

Klebens M, Morrison MA, Nadle J, (2007) Invasive methicillin-resistant staphylococcus aureus infections in the United States [archive], *J. Am. Med. Assoc.* 298:1763-1771

Kokubo K, Matsubayashi K, Tategaki H, Takada H, Oshima T (2008) Facile synthesis of highly water-soluble fullerenes more than half-covered by hydroxyl groups. *ACS Nano* 2:327-333

Kokubo K, Shirakawa S, Kobayashi N, Aoshima H, Oshima T (2011) Facile and scalable synthesis of a highly hydroxylated water-soluble fulleranol as a single nanoparticle. *Nano Res.* 4:204-215

Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40:2004-2021

Komatsu N, Ohe T, Matsushige K (2004) A highly improved method for purification of fullerenes applicable to large-scale production. *Carbon* 42:163-167

Kordatos K, Da Ros T, Bosi S, Vasquez E, Bergamin M, Cusan C, Pellarini F, Tomberli V, Baiti B, Pantarotto D, Georgakilas V, Spalluto G, Prato M (2001) Novel Versatile Synthons. *J. Org. Chem.* 66:4915-4920

Kordatos K, Bosi S, Da Ros T, Zambon A, Lucchini V, Prato M (2001) Isolation and characterization of all eight bisadducts of fulleropyrrolidine derivatives. *J. Org. Chem.* 66:2802-2808

Kroto, H, Heath J, O'Brien S, Curl R, Smalley R (1985) C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature* 318:162-163

Lazarev VN, Parfenova TM, Gularyan SK, Misyurina OY, Akopian TA, Govorun VM (2002) Induced expression of melittin, an antimicrobial peptide, inhibits infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* in a HeLa cell line. *Int. J. Antimicro. Ag.* 19:133-7

Lazarev VN, Shkarupeta MM, Titova GA, Kostjukova ES, Akopian TA, Govorun VM (2005) Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* infections in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:946-50

Leroueil P, Hong S, Mecke A, Baker J, Orr B, Holl M (2007) Nanoparticle interaction with biological membranes: Does nanotechnology present a Janus face? *Acc. Chem. Res.* 40:335-342

Li J, Takeuchi A, Ozawa M, Li X, Saigo K, Kitazawa K (1993) C₆₀ fullerol formation catalysed by quaternary ammonium hydroxides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1784-1785

- Loufty RO, Mexler EM (2001) Feasibility of fullerene hydride as a high capacity hydrogen storage material. *Proceedings of the 2001 DOE Hydrogen Program Review* NREL/CP-570-30535
- Lu X, Bittman R (2005) Synthesis of a photoactivatable (2S,3R)-sphingosylphosphorylcholine analogue. *J. Org. Chem.* 70:4746-4750
- Maggini M, Scorrano M, Prato M (1993) Addition of azomethine ylides to C₆₀: synthesis, characterization and functionalization of fullerene pyrrolidines. *J. Am. Chem. Soc.* 115:9798-9799
- Mannock DA, Lewis R, McMullen T, McElhaney RN (2010) The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid-sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *Chem. Phys. Lipids* 163:403-448
- Mantsch HH, McElhaney RN (1991) Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 57: 213-226
- Marchesan S, Da Ros T, Prato M (2005) Isolation and characterization of nine tris-adducts of N-methylfulleropyrrolidine derivatives. *J. Org. Chem.* 70:4706-4713
- Marcotte I (2008) Notes de Cours CHI-7600, UQAM
- Mashino T, Okuda K, Hirota T, Hirobe M (1999) Inhibition of *E. coli* growth by fullerene derivatives and inhibition. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 9:2959-2962
- Mateo-Alonso A, Tagmatarchis N, Prato M (2006) Fullerenes and Their derivatives. In: Gogotsi Y (ed), *Carbon Nanomaterial*. Taylor & Francis, London, pp 1-39
- Mathew AG, Cissell R, Liamthong S (2007) Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog. Dis.* 4:115-33
- Matsuo Y, Nakamura E (2008) Selective multiaddition of organocopper reagents to fullerenes. *Chem. Rev.* 108:3016-3028
- McConnell H, Radhakrishnan A (2006) Theory of the deuterium NMR of sterol-phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:1184-1189
- Mendelsohn R, Mantsch HH (1986) Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction. In: Watts A, De Pont JJHM (eds) *Progress in protein-lipid interactions*. Elsevier, Amsterdam, pp 103-146
- Mouritsen OG (2005) *Life - As a Matter of Fat*. Springer, Berlin Heidelberg, 300 pages.

Nagashima H, Terasaki H, Kimura E (1994) Silylmethylations of C_{60} with Grignard reagents: selective synthesis of $HC_{60}CH_2SiMe_2Y$ and $C_{60}(CH_2SiMe_2Y)_2$ with selection of solvents. *J. Org. Chem.* 59:1246-1248

Nakamura S, Mashino T (2009) Biological activities of water-soluble fullerene derivatives. *J. Phys. Conf. Ser.* 159:012003

Nazario M, Sanchez L, Illescas B, Pérez I (1998) C_{60} -based electroactive organofullerenes. *Chem. Rev.* 98:2527-2547

Nielsen GD, Roursgaard M, Jensen KA, Poulsen SS, Larsen ST (2008) In vivo Biology and Toxicology of Fullerenes and Their Derivatives. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103:197-208

Nierengarten JF, Lehl J, Oerthel V, Holler M, Illesca BM, Munoz, A, Martin N, Rojo J, Sanchez-Navarro M, Cecioni S, Vidal S, Buffet K, Durka M, Vincent SP (2010) Fullerene sugar balls. *Chem. Comm.* 46:3860-3862

Olah GA, Bucsi I, Lambert C, Aniszfild R, Trivedi NJ, Sensharma DK, Surya Prakash GK (1991) Chlorination and bromination of fullerenes. Nucleophilic methoxylation of polychlorofullerenes and their aluminium trichloride catalyzed Friele-Crafts reaction with aromatics to polyarylfullerenes. *J. Am. Chem. Soc.* 113:9385-9387

Overbye KM, Barrett JF (2005) Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov. Today* 10:45-52

Partha R, Conyers JL (2009) Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *Int. J. Nanomedicine* 4:261-275

Perrière JC (2001) Patients' interviews and misuse of antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 33 Suppl 3:S170-3

Pfeil A, Löffbecke S (1997) Controlled pyrolysis of the new energetic binder azide polyester PAP-G. *Propellants Explos. Pyrotech.* 22:137-142

Picard F, Paquet MJ, Lévesque J, Bélanger A, Auger M (1999) ^{31}P NMR first spectral moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membrane. *Biophys. J.* 77:888-902

Pochapsky TC (2007) *NMR for physical and biological scientists*. Jackie harbor, New York, USA, 372p

Pott T, Dufourc E (1995) Action of melittin on the DPPC/Cholesterol liquid ordered phase: a solid state 2H - and ^{31}P -NMR study. *Biophys. J.* 68:965-977

Prato M, Maggini M (1998) Fulleropyrrolidines: A family of full-fledged fullerene derivatives. *Acc. Chem. Res.* 31:519-526

- Qiao R, Roberts AP, Mount AS, Klaine SJ, Ke PC (2007) Translocation of C₆₀ and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Lett.* 7:614-619
- Rodima T, Kaljurand I, Pihl A, Mäemets V, Ieito I, Koppel IA (2002) Acid-base equilibria in nonpolar media. *J. Org. Chem.* 67:1873-1881
- Salnikov ES, Mason AJ, Bechinger B (2009) Membrane order perturbation in the presence of antimicrobial peptides by 2H solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry* 91:734-743
- Sawamura M, Likura H, Nakamura E (1996) The first pentahaptofullerene metal complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 118:12850-12851
- Sayes C, Fortner J, Guo W, Lyon D, Boyd A, Ausman K, Tao Y, Sitharaman B, Wilson L, Hughes J, West J, Colvin V (2004) The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett.* 4:1881-1887
- Scott LT, Boorum MM, McMahon BJ, Hagen S, Mack J, Blank J, Wegner H, De Meijere A (2002) A rational chemical synthesis of C₆₀. *Science* 295:1500-3
- Scott LT (2004) Methods for the chemical synthesis of fullerenes. *Angew. Chem. Int Ed. Engl.* 43:4994-5007
- Seelig J (1977) Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Q. Rev. Biophys.* 10:353-418
- Seelig J (1978) ³¹P Nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 515:105-140
- Seelig J, Seelig A (1980) Lipid conformation in model membranes and biological membranes. *Q. Rev. Biophys.* 13:19-61
- Seydel JK (2002) Function, composition, and organization of membranes. In: Seydel JK, Wiese M (eds) *Drug-membrane interactions: analysis, drug distribution and modeling*. Wiley, Weinheim, pp 3-33
- Sigwalt D, Holler M, Iehl J, Nierengarten JF, Nothisen M, Morin E, Remy JS (2010) Gene delivery with polycationic fullerene hexakis-adducts. *Chem. Comm.* 47:4640-4642
- Silverstein RM, Webster FX (1998) Infrared spectroscopy. In: *Spectrometric identification of organic compounds, 6th edition*. Taylor & Francis, London, pp 71-142
- Singer SJ, Nicholson GL (1972) The fluid mosaic model of membranes. *Nature* 175:720-731

- Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M (2003) Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet. Infect. Dis.* 3:47-51
- Singh R, Goswami T (2011) Understanding of thermo-gravimetric analysis to calculate number of addends in multifunctional hemi-ortho ester derivatives of fullerenol. *Thermochim. Acta* 513:60-67
- Sitharaman B, Asokan S, Rusakova I, Wong MS, Wilson LJ (2004) Nanoscale aggregation properties of neuroprotective carboxyfullerene (C_3) in aqueous solution. *Nano Lett.* 4:1759-1762
- Smith ICP, Ekiel IH (1984) Phosphorus-31 NMR of phospholipids in membranes. In: Gorenstein DG (ed) *Phosphorus-31 NMR: Principles and applications*. Academic Press, London, pp 447-475
- Spencer T, Yoo B, Kirshenbaum K (2006) Purification and modification of fullerene C_{60} in the undergraduate laboratory. *J. Chem. Educ.* 83:1218-1220
- Spurlin T, Gewirth A (2007) Effects of C_{60} on solid supported lipid bilayers. *Nano Lett.* 7:531-535
- Staudinger H, Meyer J (1919), Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylanderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* 2:635
- Tarasov BP, Fokin VN, Moravsky AP, Shul'ga YM, Yartis VA (1997) Hydrogenation of fullerene C_{60} and C_{70} in the presence of hydride-forming metals and intermetallic compounds. *J. Alloy Compd.* 20:253-254
- Tebbe FN, Harlow RL, Chase DB, Thorn DL, Campbell GC, Calabrese Jr JC, Herron N, Young RJ, Wasserman Jr E (1992) Synthesis and single-crystal X-ray structure of a highly symmetrical C_{60} derivative, $C_{60}Br_{24}$. *Science* 256:822-827
- Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* 119:S3-S10
- Tuktarov AR, Akhmetov AR, Pudas M, Ibragimov AG, Dzhemilev UM (2008) Selective addition of H_2O to fullerene C_{60} catalyzed by Ti, Zr, and Hf catalysts. *Tetrahedron Lett.* 49:808-810
- van Beek JD (2007) A flexible toolbox for processing, analysing and visualizing magnetic resonance data in Matlab®. *J. Magn. Reson.* 187:19-26
- Vasella A, Uhlmann P, Waldraff CAA, Diederich F, Thielgen C (1992) Fullerene sugars: Preparation of enantiomerically pure, spiro linked C-glycosides of C_{60} . *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1388-1390

- Vaultier M, Knouzi N, Carrie R (1983) Réduction d'azides en amines primaires par une méthode générale utilisant la réaction de Staudinger. *Tetrahedron Lett.* 24:763-764
- Vincent JS, Revak SD, Cochrane CC, Levin IW (1993) Interactions of model human pulmonary surfactants with a mixed phospholipid bilayer assembly: Raman spectroscopic studies. *Biochemistry* 32:8228-8238
- Vist MR, Davis JH (1990) Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ^2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* 29:451-464
- Wainwright M (1989) Moulds in ancient and more recent medicine. *Mycologist* 3:21-23
- Warschawsky DE, Arnold AA, Beaugrand M, Gravel A, Chartrand E, Marcotte I (2011) Choosing membrane mimetics for structural studies of transmembrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1808:1957-1974
- Weissberg A, Dahan A, Portnoy M, Sackler R, Sackler B (2001) Williamson ether synthesis on solid support: substitution versus elimination. *J. Comb. Chem.* 3:154-156
- Williamson A (1850) Theory of aetherification. *Philos. Mag.* 37:350-356
- Wilson SR (2002) Nanomedicine: Fullerene and Carbon Nanotube Biology. In: Osawa E, (ed) *Perspectives of fullerene nanotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Great Britain. Part IV pp 155-163
- Xing G, Zhang J, Zhao Y, Tang J, Zhang B, Gao X, Yuan H, Qu L, Cao W, Chai Z, Ibrahim K, Su R (2004) Influences of structural properties on stability of fullerenols. *J. Phys. Chem.* 108:11473-11479
- Zeeman P (1897) The effect of magnetisation on the nature of light emitted by a substance. *Nature* 55:347
- Zhang YP, Lewis RN, McElhaney RN (1997) Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior of the n-saturated 1,2-diacylphosphatidylglycerols. *Biophys. J.* 72:779-93